

Aus dem Pharmakologischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

Wirkungen des oberflächenaktiven Saponins Äscin
auf Yoshida-Ascites-Tumorzellen
und auf isoliertes epididymales Fettgewebe in vitro

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Klaus Gruber
aus Wormditt/Ostpreußen

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548818_0002

Aus dem Pharmakologischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

Wirkungen des oberflächenaktiven Saponins Äscin
auf Yoshida-Ascites-Tumorzellen
und auf isoliertes epididymales Fettgewebe in vitro

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Klaus Gruber
aus Wormditt/Ostpreußen



1. Referent: Prof. F. v. Bruchhausen
2. Referent: Prof. G. Manecke
3. Referent: Prof. H. Tiedemann

Tag der mündlichen Prüfung: 16. 9. 1976

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	1
I. Hypothesen zur Tumorentstehung (Transformation von "normalen" Zellen in Tumorzellen)	1
II. Eigenheiten von Tumorzellen gegenüber "normalen" Zellen	3
1. Änderung der Morphologie der Zelle	3
2. Änderung der Orientierung im Zellverband	4
3. Aufhebung der Kontakthemmung	5
4. Änderung der Antigenstruktur der Membran	6
5. Änderung der chemischen Zusammensetzung der Membran	9
6. Erhöhung der Transportleistung	11
7. Erhöhung der Glykolyse	13
8. Spezifische Merkmale einzelner Zellen	16
III. Plasmamembran	17
1. Membranmodelle	17
2. Funktion der Membranbestandteile	20
3. Coat, Glykocalyx	20
IV. Der oberflächenaktive Stoff, das Saponin Äscin	25
1. Struktur des Äscins	25
2. Pharmakologie des Äscins	27
B. Problemstellung	29
C. Material	31
I. Substanzen, Chemikalien	31
II. Medien	32
III. Szintillationsgemische	33
IV. Darstellung von verschiedenen "Äscinen" und Äscinderivaten	34
V. Tiere, Zellen und Gewebe	38
D. Versuchsanordnungen und ihre theoretischen Grundlagen	39
I. Fettgewebsversuche	39
1. Der Transport von Aminosäuren	40
2. Glucosetransport	43
3. Reversibilität der Äscinbindung	45
4. Kinetische Analyse des Glucosetransports	46
5. Ca^{++} , Mg^{++} -Einfluß auf die CO_2 -Produktion	46
6. Lipolyse	47

	Seite
7. Fluoreszenzmessungen	47
8. Gelchromatographie	48
9. Charakterisierungsversuche	50
II. Versuche mit Ascitestumorzellen	52
1. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Y.A.T.Z.	52
2. Lebensfähigkeit der Zellen	52
3. Aufnahme von Aminosäuren	53
4. Glucoseverbrauch	57
5. Messung der Atmung	58
6. Na^+ -, K^+ -, Ca^{++} -Fluß durch die Zellmembran	59
7. Leitfähigkeitsmessungen	62
8. Anlagerung von Äscin an Zellmembran	63
9. Titration von Y.A.T.Z.	66
10. Isoelektrische Fokussierung von Y.A.T.Z.	67
11. Fluorometrische Bestimmung von abgelöstem Zellmaterial	69
12. Gravimetrische Ermittlung des abgelösten Zellmaterials	71
13. Isoelektrische Fokussierung von Zellüberständen	71
14. Auftrennung von Zellüberständen mittels Gelchromatographie	73
15. Versuche zur Markierung und zum Wiederaufbau von abgelöstem Oberflächenmaterial	73
16. Regenerierung von abgelöstem Membranmaterial	76
E. Ergebnisse	78
I. Versuche mit epididymalen Fettgewebe der Ratten	78
1. Transport von Aminosäuren ins Fettgewebe	78
2. Zuckertransport ins Fettgewebe	80
3. Reversibilität der Äscineffekte	88
4. Kinetische Analyse des Glukosetransports	93
5. Einfluß der Erdalkalitionen Mg^{++} und Ca^{++} auf die $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung aus 1- ^{14}C -Glukose	93
6. Einwirkung von Äscin und Insulin auf die Lipolyse im Fettgewebe in vitro	99
7. Messung der Fluoreszenzintensität des Inkubationsmediums	100
8. Auftrennung des Fettgewebsmediums über Sephadex G25 fine	100
9. Untersuchungen über das Insulin-ähnliche Verhalten von Äscin	106

II. Versuche mit Yoshida-Ascitestumorzellen (Y.A.T.Z.)	115
1. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Y.A.T.Z.	115
2. Die Lebensfähigkeit von Y.A.T.Z. nach dem Einwirken von Äscin	115
3. Transport von Aminosäuren	116
4. Glukoseverbrauch durch Y.A.T.Z.	126
5. Atemmessung nach Warburg	126
6. Ionenflüsse durch die Zellmembran von Y.A.T.Z.	130
7. Leitfähigkeitsmessungen	144
8. Die Anlagerung von Äscin an die Membran von Y.A.T.Z.	144
9. Titration von Y.A.T.Z.	145
10. Isoelektrische Fokussierung von Y.A.T.Z.	152
11. Fluorometrische Bestimmung von Zellmaterial	152
12. Gravimetrische Ermittlung des abgelösten Zellmaterials	153
13. Isoelektrische Fokussierung des durch Äscin abgelösten Membranmaterials	159
14. Auftrennung von abgespaltenem Material mittels Gelchromatographie	161
15. Markierung von oberflächlichen Membranbestandteilen	174
16. Regenerierung von abgelösten Membranmaterial	179
F. Diskussion	185
I. Fettgewebe	185
II. Yoshida-Ascitestumorzellen	193
G. Zusammenfassung	217
H. Anhang	221
J. Literaturnachweise	

A. EINLEITUNG

I. Hypothesen zur Tumorentstehung

Tumorzellen können aus normalen Zellen spontan oder durch Einwirkung von Viren, chemischen Substanzen und energiereicher Strahlung entstehen. Die Transformation einer Normalzelle zur Tumorzelle erfordert eine vielfältige Wechselwirkung zwischen Virus, Wirtszelle und äußeren Bedingungen (Falke, 1971; Westphal, 1972). Für den Vorgang einer Virustransformation haben Huebner und Todaro (1969, 1972) die RNS-Virus-Onkogen-Hypothese und Temin (1970, 1971a, 1971b) die Provirus- bzw. Protovirus Hypothese aufgestellt. Todaro und Huebner schlossen aus dem allgemeinen Vorkommen von Onkorna-Viren des C-Typs, tumorerzeugenden RNS-Viren in verschiedenen Spezies (Payne und Chubb, 1968; Weiss, R.A., 1969; Chopra et al., 1970a, 1970b; Gilden et al., 1970; Coffin und Temin, 1971; Mitchell et al., 1971) und möglicherweise auch beim Menschen (Feller und Chopra, 1968; Schäfer, 1969; Todaro et al., 1970; Priori et al., 1971; McAllister et al., 1972), daß diese Leukämie verursachenden Viren in den Zellen aller Wirbeltiere vorhanden sind und als Bestandteil des genetischen Materials vererbt werden. Durch ein Proteinrepressorsystem sollen sowohl das für die Transformation verantwortliche genetische Material, das Onkogen, als auch das für die Bildung der Virusteilchen erforderliche genetische Material, das Virogen, kontrolliert werden. Wird das Kontrollsystem z. B. durch Brom- bzw. Joddesoxyuridin (Lowry et al., 1971) oder Methylcholanthren (Tanaka, 1965) außer Kraft gesetzt, so beginnt die Transformation der Zelle und die Produktion von Viren.

Der Provirus-Hypothese (Temin, 1971a) zufolge erhält die Zelle die zellverändernde Information von außen. Nach dem Eindringen eines RNS-Virions, eines Virus ohne äußere Membran, kommt es zur Bildung von Virus-DNS, die als "Provirus" in den genetischen Code der Zelle integriert wird.

Gemäß der Protovirus-Hypothese (Temin, 1970, 1971a, 1971b) können einzelne Bestandteile der DNS einer Zelle allein reproduziert werden, die dann in die DNS derselben oder einer benachbarten Zelle eingebaut werden.

Das Ergebnis ist in beiden Fällen die Transformation der Zelle und die Synthese von Viren.

Eine weitere, verallgemeinernde Hypothese stammt von Burton (1971). Danach führt die Störung eines der drei wesentlichen Merkmale einer normalen Zelle - periodisch wechselnde Konzentration von Schlüsselsubstanzen, asynchroner Phasenverlauf während des Zellzyklus und gute Kommunikation der Zellen untereinander - zu vermehrter Zellteilung, einem charakteristischen Kennzeichen von Tumorzellen.

Wie weit eine der Hypothesen der Wirklichkeit nahekommt, läßt sich bisher nicht mit Sicherheit aussagen, doch haben die experimentellen Befunde der letzten Zeit zu vorsichtigen Spekulationen Anlaß gegeben, wonach alle Tumoren durch Viren erzeugt werden könnten (Falke, 1971; Schäfer, 1972).

II. Eigenheiten von Tumorzellen gegenüber "normalen" Zellen

Die Veränderungen, die bei einer Zelle nach ihrer Transformation zur Tumorzelle auftreten, sind zahlreich und unterschiedlicher Natur. Trotzdem kennt man bis heute nicht ein einziges signifikantes Membran- oder Zellcharakteristikum, das mit Tumorgenese unabdingbar verknüpft ist (Haguenau, 1969). Zu den Unterschieden zwischen transformierten und nicht transformierten Zellen gehören:

1. die Änderung der Morphologie der Zelle
2. die Änderung der Orientierung im Zellverband
3. die Aufhebung der Kontakthemmung
4. die Änderung der Antigenstruktur der Membran
5. die Änderung der chemischen Zusammensetzung der Membran
6. die Erhöhung der Transportleistung
7. die Erhöhung der Glykolyse
8. besondere Merkmale einzelner Zellen

1. Änderung der Morphologie der Zelle

Abercrombie und Ambrose (1958, 1962) beobachteten, daß normale Fibroblasten gewöhnlich ein einziges ausgedehntes, fächerförmiges Pseudopodium, Scheinfüßchen besitzen, das die Bewegungsrichtung der Zelle bestimmt, während die Membran vieler Sarkomzellen häufig in eine große Anzahl von kleinen, in der Bewegungsrichtung voneinander unabhängigen Pseudopodia, Mikrovilli untergliedert ist.

Mittels der Technik der "hochauflösenden negativen Phasenkontrast-Film-Mikrographie", der Möglichkeit durch ein Mikroskop zu filmen,

konnte Vesely (1972) demonstrieren, daß Tumorzellen im Vergleich zu den Ausgangszellen häufiger und in größerer Anzahl Mikrovilli ausstülpfen und wieder zurückbilden und daß mit dieser Eigenschaft vermehrte Pinozytose verbunden ist. Im Gegensatz zu normalen Zellen bleibt die Fähigkeit der Pinozytose auch bei Kontakt mit anderen Zellen erhalten.

2. Änderung der Orientierung im Zellverband

Bei der Transformation tritt eine Entdifferenzierung, d. h. eine Verminderung der intrazellulären Spezialisierung ein. Als Folge hören die entarteten Zellen während der Mitose auf, Gewebe der charakteristischen Anordnung ihrer "normalen" Ausgangszellen zu bilden. Die Kommunikation der einzelnen Zellen untereinander verringert sich. McNutt et al. (1970) fanden bei elektromikroskopischen Untersuchungen an transformierten Fibroblasten häufig eine beträchtliche Verringerung von Verbindungskanälen gegenüber Normalzellen.

Mit der Transformation ändert sich meist auch die Adhäsion und zwar wird sie im Normalfall kleiner (Coman, 1955, 1960, 1961; Coman und Anderson, 1955). Verantwortlich für die Abnahme wurden vor allem die häufig erhöhte negative Ladung transformierter Zellen und die daraus resultierenden abstoßenden Coulombkräfte gemacht (Ambrose et al., 1956; Forrester et al., 1962, 1964). In diesem Zusammenhang tauchte die Vermutung auf, daß die endständige Sialinsäure, die einen Beitrag von über 30% zur gesamten negativen Oberflächenladung liefert (Forrester et al., 1962), eine wichtige Rolle spielt. In einigen Fällen ließ sich die erhöhte anodische Beweglichkeit und der Gehalt an Sialinsäure durch enzymatische Abspaltung mit Neuraminidase in direkten Zusammenhang setzen (Culp et al., 1971). In anderen Fällen wurde an transformierten Zellen trotz erhöhter Beweglichkeit bzw. verllorener Kontakthemmung ein geringerer Gehalt an Neuraminsäure gefunden (Forrester et al., 1962, 1964; Ohta et al., 1968;

Grimes, 1970). Die unterschiedlichen Ergebnisse begründete Jallach et al.(1966) mit der geringen Kenntnis

1. des effektiven Radius der ladungstragenden Stellen
2. der anderen Membranladungen und
3. der Ladungstiefe in der Membran.

Die Abspaltung von Sialinsäure durch Neuraminidase bewirkt ferner eine Erhöhung der Adhäsion. Abgesehen von den veränderten elektrostatischen Kräften machten Abercrombie und Ambrose (1962) für diesen Anstieg eine Protein- bzw. Mucoproteinkomponente der Membran verantwortlich, Weiss, L. (1965) dagegen gesteigerte Deformierbarkeit der Membran und Vicker und Edwards (1972) die Freisetzung von Rezeptorstellen.

Die Änderung der Oberflächenladung ist so häufig, daß zunächst ein Anstieg der negativen Ladung mit gesteigerter Tumorbösartigkeit d. h. hohem Infiltrationsvermögen und Metastasenbildung in direkte Beziehung gesetzt wurde (Vassar, 1963; Simon Reuss et al., 1964). Aber obwohl die durch die vermehrte Anzahl von negativer Ladung verursachte Erhöhung der Beweglichkeit durch elektrophoretische Messungen in beiden Fällen bestätigt werden konnte, ließ sich auch hier keine allgemeingültige Beziehung aufstellen in der Art:

Erhöhung der negativen Ladung führt zu erhöhter Malignität.

3. Aufhebung der Kontakthemmung

Ein häufig auftretendes Kennzeichen zwischen normalen und transformierten Zellen ist das unterschiedliche Verhalten bei Kontakt mit anderen Zellen. Während bei normalen Zellen Zellberührung die sogenannte Kontakthemmung der Beweglichkeit und des Wachstums auslöst, erfahren transformierte Zellen meist keine Einschränkung in ihrer Bewegung, in der Ausbildung von Mikrovilli und in ihrer

Mitosefähigkeit. Ohta et al., (1968) zeigten am Beispiel dreier transformierter Zellstämme, daß aber kein direkter Zusammenhang zwischen dem Verlust der Kontakthemmung und dem Gehalt an Sialinsäure besteht. Den Unterschied in der Mitosefähigkeit führte Temin (1967, 1968, 1971b) auf eine geringere benötigte Konzentration von spezifischen Teilungs-stimulierenden Faktoren zurück. Schnebli (1972a, 1972b) dagegen formulierte eine andere Möglichkeit der Kontakthemmung. Nach seiner Hypothese sollen normale Zellen zwei spezifische Rezeptoren (W und Y) besitzen, die sich bei Zellberührung miteinander verbinden, während transformierte Zellen nur einen Rezeptor aufweisen. Nachdem an der Oberfläche transformierter Zellen 3-10fach erhöhte Aktivität von Proteasen nachgewiesen wurde, könnte ihrer proteolytischen Fähigkeit ein Rezeptor zum Opfer gefallen sein. Dadurch würde eine Zelle die Fähigkeit verlieren, sich mit einer anderen zu koppeln. Die resultierende Aufhebung der Wachstumsbegrenzung wäre erklärbar. Die Einwirkung von Serumalbumin, Insulin oder Trypsin auf normale Zellen, wodurch kurzfristig die Kontakthemmung außer Kraft gesetzt wird, könnte durch vorübergehende Blockierung eines Rezeptors zustande kommen. Andererseits kennt man bei einigen Tumorzellen Kontakthemmung bei der Berührung mit normalen Zellen oder anderen Tumorzellarten (Stoker, 1964; Barski und Belehradek, 1965; Borek und Sachs, 1966; Kohn und Fuchs, 1970), sodaß auch das Prinzip des zügellosen Wachstums nicht gewährleistet ist.

4. Änderung der Antigenstruktur der Membran

Einen breiten Raum in der Tumorforschung beansprucht heute die Immunbiologie. Eines ihrer Ziele ist es, nähere Aufschlüsse über Veränderungen der Antigenstruktur in der Membran transformierter Zellen zu erhalten. Bereits innerhalb von 6 Stunden nach der Infizierung einer Zelle kann sich die Antigenzusammensetzung geändert haben (Rossi et al., 1970). Und zwar können durch

Neubildung oder durch Beseitigung von Deckmaterial neue Antigene auftauchen bzw. ursprünglich vorhandene verloren gehen.

Chemisch induzierte Tumoren zeigen häufig tumorspezifische Transplantationsantigene (Baldwin et al., 1971), während Virus-induzierte Tumoren meist vom Gewebe unabhängig Virus-spezifische Antigene (Habel, 1965; Vogt et al., 1965; Geering et al., 1968; Klein, 1970; Rhim et al., 1972) und nur gelegentlich Tumor-spezifische Antigene aufweisen (Vaage, 1968; Pasternak, 1968; Aoki et al., 1970). Überdies führte die Transformation von Zellen in manchen Fällen zum Erscheinen embryonaler Antigene. So konnte man an "erwachsenen" Hamsterfibroblasten, die durch Polyoma-, Rous- oder SV 40-Viren transformiert wurden (O'Neill, 1968; Robertson und Black, 1969; Siskind und Benacerraf, 1969), das Forssman-Antigen, ein Differenzierungsantigen vieler tierischer embryonaler Zellen nachweisen. Ein interessanter Zusammenhang zwischen embryonalen Antigenen und elektrophoretischer Beweglichkeit (EPM) ergab sich aus der Beobachtung, daß embryonale Leberzellen und Hepatomzellen durch Zusatz von Antiserum gegen embryonales Gewebe oder durch Behandlung mit Neuraminidase bis zu 50% ihrer EPM einbüßten, während dieselbe Behandlung bei "erwachsenen" Leberzellen nur einen Verlust bis 15% nach sich zog (Woo und Cater, 1972).

Der Verlust von Organ-spezifischen Antigenen wurde insbesondere an Lebertumoren untersucht (Abelev, 1965; Baldwin und Graves, 1972).

Die chemische Zusammensetzung vieler Antigene ist bekannt. Sie weisen Glykoprotein- bzw. Glykolipidstruktur auf (Shimada und Mathenson, 1969; Yamane und Mathenson, 1970). Für das H-2-Antigen fanden Muramatsu und Mathenson (1970), daß der 10% Zuckeranteil aus Galaktose, Mannose, Fucose, Glucosamin und Sialinsäure besteht.

Der Versuch, Rezeptoren der Membranoberfläche mittels einer Antigen-Antikörper Reaktion zu charakterisieren,

wies erhebliche Schwierigkeiten auf wegen der Notwendigkeit, jeweils saubere spezifische Antikörper einzusetzen. Dagegen erleichterte der Einsatz von einfach zugänglichen pflanzlichen Proteinen, den Agglutininen bzw. Lektinen, die sich wie Antikörper an spezifische Membranrezeptoren binden, die Erforschung von Oberflächenbestandteilen. Ob die Agglutininbindungsstellen den spezifischen Antigenen ähnlich sind und ob eine Beziehung zwischen ihnen besteht, ist bisher ungeklärt (Tevethia et al., 1972a). Zu den bekanntesten Vertretern gehören Concanavalin (Con A), Soyabohnen und Weizenkeimagglutinin. Die Agglutinine binden sich an spezifische Zuckerrezeptoren der Membran, so z. B. Con A an endständige nicht reduzierende α -D-Glucopyranosyl-, α -D-Mannopyranosyl- (Oppenheimer et al., 1969; Inbar und Sachs, 1969; Goldstein und So, 1969a) oder β -D-Fructofuranosyl-Reste (So und Goldstein, 1968; Goldstein et al., 1969) und Soyabohnen- und Weizenkeimagglutinin an N-Acetyl-D-Glucosamin bzw. -D-Galactosamin (Burger und Goldberg, 1967; Kornfeld et al., 1971; Inbar et al., 1972). Diese Pflanzenproteine sind wie Antikörper divalent (So und Goldstein, 1968; Bernhard und Avrameas, 1971). Während die eine Valenz durch Bindung an die Membranrezeptoren abgesättigt werden kann, läßt sich die andere für elektronenmikroskopische Untersuchungen mit Ferritin bzw. Cytochromperoxidase (Stobo und Rosenthal, 1972; Garth et al., 1971) und für Fluoreszenzmessungen mit Fluoresceinisothiocyanat markieren (Smith und Hollers, 1970; Buffe et al., 1971; Inbar et al., 1973). Auf diese Weise eignen sich die Agglutinine vorzüglich als Fixationsmittel für eine kohlenhydratreiche Schicht auf der Membranoberseite, die Coat bzw. Glycocalyx genannt wird (Roth et al., 1972a,b) Smets et al., 1972; Huet und Garrido, 1972; Huet und Herzberg, 1973). Das Ausmaß der Agglutination hängt von verschiedenen Faktoren ab, u. a. von der Art des Lektins (Tomita et al., 1970), vom Zeitpunkt der Inokulation (Goto et al., 1972), vom Zellzyklus (Fox et al., 1971),

von der Temperatur (Eckhart et al., 1971; Inbar et al., 1971; Burger und Martin, 1972) und von der Verteilung der Rezeptorenstellen (Inbar und Sachs, 1969b; Martinez-Palomo, 1972). Normale Zellen reagieren mit Agglutininen meist erst nach der Behandlung mit Proteasen (Inbar und Sachs, 1969a, 1969b; Goto et al., 1972), während bei transformierten Zellen in vielen Fällen die Rezeptoren ständig reaktionsfähig sind (Inbar und Sachs, 1969a; Burger und Goldberg, 1967). Eine erste Membranänderung bei Hühnerembryozellen läßt sich bereits 2-4 Stunden nach einer Virusinfektion durch erhöhte Agglutinationsfähigkeit nachweisen (Tevethia et al., 1972b). Dieses Ergebnis läßt sich einmal auf die Freilegung von Kryptorezeptoren (Burger und Noonan, 1970; Roth et al., 1973), zum anderen auf die Erhöhung der Zahl der Bindungsstellen gegenüber Kontrollen zurückführen (Scott und Marchesi, 1972). Normale Zellen, deren Agglutinationsrezeptoren mittels Proteaseeinwirkung freigelegt sind, verhalten sich bezüglich ihrer Teilungsfähigkeit wie quasi-Tumorzellen (Burger, 1973). Umgekehrt wird die Vermehrungsaktivität von Tumorzellen, deren Rezeptoren mit univalenten Con A besetzt wurden, herabgesetzt (Burger und Noonan, 1970). Es kommt zur Kontakthemmung. Zahlreiche Abweichungen von diesen Befunden zeigten, daß es leider nicht möglich ist, die Agglutinationsfähigkeit als Maß für die Malignität festzusetzen (Moore und Temin, 1971; Weiss, R.A. et al. 1973).

5. Änderung in der chemischen Zusammensetzung der Membran

Die maligne Entartung einer Zelle verursacht Veränderungen aller Membranbestandteile, der Glykoproteine, der Glykolipide und der Zucker. Die Unterschiede betreffen sowohl die qualitative als auch die quantitative Zusammensetzung der Membran im molekularen Bereich und in direktem Zusammenhang veränderte Enzymaktivitäten. So liegt der bereits erwähnten Tumor-bedingten Antigenstruktur eine Änderung des Glykoprotein- bzw. Glykolipidgehaltes

zu Grunde. Buck, Glick, Warren und Fuhrer (1970, 1971a, 1971b, 1973) fanden bei der Auftrennung von Membranmaterial, das mit Fucose vormarkiert, mit Trypsin abgespalten und schließlich mit Pronase in Bruchstücke zerlegt wurde, bei der Gelfiltration mit Sephadex G 50 bei transformierten BHK₂₁/C₁₃ bzw. 3T3-Zellen eine Anreicherung von Fucose-markierten Glykopeptiden mit höherem Molekulargewicht. Sakiyama und Robbins (1973) wiesen bei transformierten Hamsterzellen auf eine Beziehung zwischen dem von der Zelldichte abhängigen Stop der Glykolipidsynthese und erhöhter Malignität hin. In Übereinstimmung hiermit stellten Mora et al. (1971) und Brady et al. (1973) bei transformierten Mäusezellen eine Abnahme von Gangliosiden, sauren Glykolipiden, fest. Zugleich mit der Lipidreduktion geht auch eine Verringerung der Enzymaktivität der N-acetylgalactosamintransferase, einher. Nach maligner Entartung lassen sich ferner Veränderungen der Phospholipide feststellen. Bergelson et al. (1970) berichteten, daß einerseits der Gehalt der einzelnen Phospholipide bei Rattenhepatomzellen in den verschiedenen Zellfraktionen nahezu gleich ist, während normale Rattenleberzellen beträchtliche Unterschiede in den einzelnen Fraktionen aufweisen. Andererseits steigt in den Plasmamembranen der Hepatomzellen der Gehalt an Cardiolipin, Phosphatidylserin und Lysolecithin gegenüber Kontrollzellen auf den 2-4fachen Wert. Bei Phospholipiden von transformierten Fibroblasten aus Hühnerembryonen wurde eine Abnahme der mehrfach ungesättigten Fettsäure Arachidonsäure zu Gunsten der einfach ungesättigten Ölsäure festgestellt (Bosmann, 1972).

Eine Aussage über eine Veränderung des Kohlenhydratanteils liefert die Anfärbemethode mit Rutheniumrot nach Luft (1966) und die anschließende elektronenmikroskopische Untersuchung. Rutheniumrot dient zur Anfärbung saurer Mucopolysaccharide, die als Bestandteile u. a. Sialinsäure, Hyaluronsäure, Hexosen und Hexosamin aufweisen.

Martinez-Palomo (1968) und Morgan (1970) beobachteten bei transformierten Fibroblasten einen Anstieg der Dicke der Mucopolysaccharidschicht. Montagnier (1970) führte die verstärkte Anfärbung der Polysaccharidschicht bei transformierten BHK₂₁/C₁₃ Zellen auf eine vermehrte Affinität für Rutheniumrot zurück, die durch Entfernung von Oberflächenproteinen und damit gleichzeitig freigelegten negativen Ladungen verursacht sein soll. Es wurden aber auch transformierte Zellen ohne charakteristischen Unterschied der färbbaren Schicht festgestellt (Vorbrott und Koprowski, 1969). Für die Unterschiede der Mucopolysaccharidschicht sollen veränderte Enzymaktivitäten verantwortlich sein. So fanden Warren et al. (1973) und Bosmann (1972) in transformierten Zellen eine 2-6 bzw. eine 2-11fach erhöhte Sialyltransferaseaktivität, Bosmann (1970) eine 2fach vermehrte Glucosamintransferaseaktivität und Morgan (1970) eine verstärkte Hyaluronsäuresynthetaseaktivität.

6. Erhöhung der Transportleistung

Die Tumorgenese führt bei einigen Zellarten zu einem beträchtlichen Anstieg der Transportleistung für Zucker und Aminosäuren. So fanden Hatanaka et al. bei Zellen von Rattenembryonen (1970a), die mit Viren des Mäuse-Sarkoms (MS) transformiert wurden, abhängig vom Zeitpunkt der Infektion, einen Anstieg der Glucose- und Mannoseaufnahme auf den vierfachen Wert, in analogen Mäusezellen (1969, 1970b) sogar eine Steigerung auf das 20-fache. Der Anstieg erfolgt in einem Zeitraum von 5 min. und in einem Bereich von 4-37°C linear. Gleichzeitig verringert sich K_{max} , die charakteristische Konzentration nach Lineweaver-Burk ermittelt, auf das 5-10-fache, während V_{max} , die maximale Geschwindigkeit, keine Veränderung erfährt. Gleiche Tendenz zeigen durch Polyoma-Viren transformierte Hamsterzellen durch 2-3-fache Anreicherung von Galactose gegenüber Kontrollzellen

(Kalckar et al., 1973). Auf den etwa 3-fachen Wert gegenüber Kontrollzellen wird die intrazelluläre Konzentration der 2-Desoxyglukose - eines Zuckers, der im Zellinneren zwar phosphoryliert, aber nicht verstoffwechselt wird - in MS-Viren-transformierten embryonalen Mäuse- oder Rattenzellen erhöht (Hatanaka 1970a, 1970b) und in Polyoma-transformierten BHK-Zellen (Isselbacher, 1972).

Nach Colby und Romano (1975) beruht die erhöhte intrazelluläre Konzentration nicht auf einer gesteigerten Transportleistung, sondern allein auf der vermehrten Phosphorylierung des Zuckers. Schließlich erhöht sich auch die Influx- bzw. Effluxgeschwindigkeit von 3-O-Methylglukose in MSV-transformierten Hühner-Embryofibroblasten auf den 3-fachen Wert (Venuta und Rubin, 1973). 3-O-Methylglukose dient häufig als Modellzucker für Transportvorgänge, da er nach Aufnahme in die Zelle unverändert bleibt. Die vermehrte Transportleistung soll als Folgeerscheinung von spezifischen Veränderungen des Zuckertransportsystems auftreten. Und zwar könnte die Steigerung durch eine vergrößerte Anzahl oder durch erhöhte Beweglichkeit des Zuckercarriers verursacht sein.

Eine Untersuchung des Aminosäuretransportes ergab bei transformierten Zellen ebenfalls ein verändertes Bild. Zwar weisen 3T3-Zellen, die durch Polyoma- bzw. SV 40-Viren transformiert wurden (Foster und Pardee, 1969), und durch Polyoma-Viren transformierte BHK-Zellen (Isselbacher und Balko, 1972) dieselbe Influxgeschwindigkeit für α -Aminoisobuttersäure und Cycloleucin auf, andererseits aber resultierte im Zellinneren ein Anwachsen der Konzentration auf den 3-fachen Wert. Die beiden erwähnten, nicht essentiellen Aminosäuren finden in der Praxis bevorzugt als Modellsubstanzen für Transportvorgänge Verwendung, da sie zwar in der Zelle aufgenommen aber nicht verstoffwechselt werden. Ein wichtiger Transportvorgang, der nach der Transformation der Zelle ebenfalls eine Steigerung erfährt,

ist die Aufnahme von Phosphat in mittels Polyoma-Viren transformierte BHK₂₁-Zellen (Jullien et al., 1972). Eine mögliche Folge dieses vermehrten Phosphateinstroms könnte nach Racker (1972) der bekannte Anstieg des Glukosemetabolismus, speziell der Glykolyse sein. Für die Zukunft sind eine Anzahl von neuen Einzelbefunden von Transportveränderungen nach Tumorgenese zu erwarten. Alle bisherigen Ergebnisse aber deuten darauf hin, daß Transportänderungen sekundärer Natur sind, die durch primäre Veränderungen in der Membran verursacht werden.

7. Erhöhung der Glykolyse

Der bereits erwähnte, erhöhte Glukosemetabolismus ist ein weit verbreitetes Kennzeichen von Tumor- bzw. transformierten Zellen. Die beiden Stoffwechselwege für Glukose, der Pentosephosphatweg (Warburg-Dickens-Horecker Schema) und die Glykolyse (Emden-Meyerhof-Parnas Schema) mit nachfolgendem anaeroben Abbau zur Milchsäure bzw. aeroben Abbau über Zitronensäurezyklus und oxydativer Phosphorylierung, sind durch die gemeinsamen Glieder Glukose-6-phosphat, Fructose-6-phosphat und Glycerinaldehydphosphat eng miteinander verbunden und können sich gegenseitig beeinflussen (Abb. 1). Während der Verlauf des Pentosephosphatzyklus und der Glykolyse bekannt ist, ist der Mechanismus der oxydativen Phosphorylierung unbekannt. Für den Ablauf der oxydativen Phosphorylierung gibt es mehrere Theorien: die chemische Hypothese (Racker, 1965), die Konformationshypothese (Boyer, 1965), die chemiosmotische Hypothese von Mitchell (1966) und eine weitere Hypothese von Racker (1972). Der letztgenannten Hypothese zufolge hat eine ausgelöste, andauernde intrazelluläre pH-Änderung die Störung von Regelmechanismen, u.a. den der Glykolyse und den des Wachstums, zur Folge.

Als Maß für die Glykolyse kann das Verhältnis der Laktatmenge, die pro Glukoseverbrauch gebildet wird, gelten, während die $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung aus $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glukose als Meßgröße für den Pentosephosphatweg eingeführt wurde, da der Hauptanteil dieses $^{14}\text{CO}_2$ über den Pentosephosphatweg gebildet wird (Brand und Deckner, 1970) und da während der Glykolyse - bei der Entstehung von Lactat aus Glukose - kein CO_2 freigesetzt wird. Bereits 1926/1930 beschrieb Warburg bei einer Reihe von verschiedenen Tumoren eine hohe anaerobe Glykolyse-rate, deren Ursache er in einer Störung der Atmungskette vermutete und die er in Zusammenhang mit Tumorbösartigkeit setzte. Zu teilweise ähnlichem Ergebnis kamen Burk et al. (1967), die an Hand von unterschiedlich schnell wachsenden Zellen des Morris-Rattenhepatoms eine Beziehung zwischen anaerober Glykolyse, Wachstum und Malignität aufstellten. Trotz einer großen Anzahl von Arbeiten ergab sich wegen des komplexen Sachverhalts bis heute kein einheitliches Bild. Wu und Racker (1959) wiesen auf mehrere Fakten hin, die für den veränderten Zuckerstoffwechsel verantwortlich sein sollen, u.a. die erhöhte Aktivität der Glykolyseenzyme und das unterschiedliche Verhalten gegenüber der Phosphat- und Glukosekonzentration im Medium. Im Einklang damit fanden Gumaa und McLean (1969) geringere Aktivitäten der Enzyme des Pentosephosphatweges. Nur 1 % des Glukosefluxes soll diesen Weg beschreiten. Bissell et al. (1972) zeigten, daß das Verhältnis des produzierten Lactats bezogen auf den Glukoseverbrauch zu gebildetem CO_2 , grob also das Verhältnis des glykolytischen Weges gegenüber dem Pentosephosphatweg, bei transformierten Zellen in jedem Fall größer ist als bei normalen Zellen und daß dieses Verhältnis in hohem Maß nicht von der Wachstumsgeschwindigkeit, sondern von der Zelldichte abhängt. So besitzen langsam, aber in großer Zelldichte wachsende Zellen einen höheren Wert des Lactats- CO_2 -Verhältnisses als schnell aber vereinzelt wachsende Zellen. Allgemein hat sich die Vorstellung durchgesetzt, daß Änderungen der Stoffwechselvorgänge wie auch der Transportabläufe sekundärer Natur sind.

SCHEMA DES GLUCOSESTOFFWECHSELS

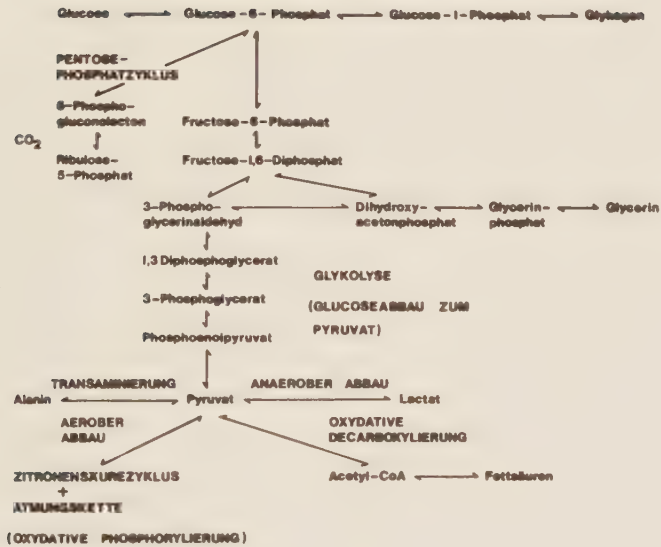


Abb. 1

8. Spezifische Merkmale einzelner Zellen

Neben den beschriebenen Änderungen nach Tumorgenese, die bei zahlreichen, verschiedenen Zellarten gefunden wurden, ist eine Palette von Unterschieden gegenüber Kontrollzellen bekannt, die nur vereinzelt festgestellt oder bisher nur bei wenigen Zellarten untersucht wurden. Meadows (1971) zeigte an Helatumorzellen eine verstärkte und weniger geordnete Markierung mit Fluoreszenzbakterien, Ägren und Ronquist (1968) entdeckten die Fähigkeit von Ehrlichascitistemorzellen und Helazellen, mittels der an der Membranoberfläche vorhandenen Enzyme Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase und Phosphoglyceratkinase extrazelluläres ATP zu bilden. Yoshikawa und Nojima fanden, daß hohe K^+ -Konzentrationen das Wachstum von SV 40 transformierten 3T3-Zellen gegenüber Kontrollzellen weniger hemmen. Zugleich besitzen die 3T3-Zellen eine höhere ATPase und Adenylcyclase-Aktivität und entsprechend der Adenylcyclase einen vermehrten Gehalt an cyclischen AMP, wodurch das Wachstum stärker eingeschränkt wird. Nach Montagnier (1969) soll für das Wachstum von BHK₂₁/C₁₃-Zellen die nichtessentielle Aminosäure L-Serin erforderlich sein. Außerdem soll für das Auftreten der Transformationsbedingten Oberflächenveränderungen die Anwesenheit von Adeninucleotiden im Nährmedium erforderlich sein (Torpier und Montagnier, 1970).

Ebenfalls einen Hinweis auf die mögliche Wichtigkeit der Nucleotide lieferten Sheppard et al. (1971), die feststellten, daß bei Zellen, die mit onkogenen Viren infiziert wurden, einer Veränderung der Membran immer die Produktion von Virus-induzierter DNS vorausgeht.

III. Die Plasmamembran

1. Membranmodelle

Die Vielzahl und Vielfalt der Unterschiede, die beim Übergang von einer normalen Zelle zur Tumorzelle auftreten, vermitteln kein einheitliches Bild über den Verlauf der Transformation. Da aber bei diesem Vorgang Veränderungen gegenüber Kontrollzellen sich häufig zuerst in der Plasmamembran manifestieren, spielt die Membran bei der Tumorgenese offenbar eine entscheidende Rolle. Aus diesem Grund soll im folgenden auf den Aufbau der Oberflächenmembran näher eingegangen werden.

Während die chemische Zusammensetzung der Plasmamembran der verschiedenen Zellen aus Lipiden, Proteinen und Kohlehydraten bekannt ist, gibt es über ihre Struktur kein einheitliches Konzept, vielmehr existieren eine Anzahl mehr oder weniger unterschiedlicher Theorien (Robertson, 1957; Sjöstrand, 1963a, 1963b, 1968; Lucy, 1964a, 1964b, 1968; Green, 1966; Wallach, 1966b; Lenard und Singer, 1966, 1968; Korn, 1966; Kavanau, 1966; Benson, 1968; Hybl und Dorset, 1970; Glaser et al., 1970; Singer und Nicolson, 1972; Fox, 1972). Einen Überblick über einzelne Modelle und ihre Bewertung haben Zahler (1969) und Hendler (1971) gegeben. Von Robertson (1957) stammt das schon klassische Modell, der unit membrane, der Einheitsmembran, das auf den Vorstellungen von Danielli und Davson (1935) zurückgeht. Danach soll jede Membran trilaminar aufgebaut sein, und zwar aus einem bimolekularen Lipidfilm, an dessen Oberfläche beidseitig je eine Proteinschicht angelagert ist. Die hydrophilen Gruppen der Lipide stellen die Bindung zu den Proteinen her, während die apolaren Kohlenwasserstoffreste in einem relativ ungeordneten Zustand in einer quasi flüssigen

Phase vorliegen. Aus der Idee einer statischen universellen Membran hat sich neuerdings das Bild einer dynamischen, differenziert aufgebauten Membran entwickelt, die aus einzelnen Untereinheiten besteht und die außerdem Konformations- und Phasenänderungen erfahren kann (Träuble, 1971). An Hand kalorimetrischer (Chapman, 1973), röntgenographischer (Levine und Wilkins, 1971; Shipley, 1973), optischer (Träuble, 1971) und Kernresonanzmessungen (Lee et al., 1973) wurde festgestellt, daß die Lipide in der Membran z. T. große Beweglichkeit aufweisen, daß sie z. T. in einer Art flüssigen Zustands vorliegen und daß die Umwandlungstemperaturen des Membranlipidgemisches von dem kristallinen in den flüssigen Zustand nahe der physiologischen Temperatur von 37°C liegen. Lee et al. (1973) konnten mittels der ^{13}C -Fourier-NMR-Spektroskopie aufzeigen, daß Lipide sich zwar schnell parallel zur Membranoberfläche bewegen können, daß aber trotz der angenommenen Diffusion nicht eine völlig willkürliche Lipidverteilung vorliegt, sondern daß durchaus Gebiete mit diskontinuierlicher Lipidzusammensetzung existieren. In der Ebene der flüssigen Lipidschicht können auch die Membranproteine ihre Lage verändern. Von der Existenz schnell beweglicher Antigene und Rezeptoren der Oberfläche wurde berichtet (Frye und Edidin, 1970; Yahara und Edelman, 1972; Inbar et al., 1973; Raff und De Petris, 1973). Die Beweglichkeit der Rezeptoren soll nach Einwirkung von Concanavalin A zu einer Anhäufung an definierten Stellen führen, wodurch die Bindung zwischen den beiden Komponenten erst möglich wird.

Ein wichtiges Merkmal, das auf den hohen dynamischen Zustand der Membran hinweist, beschreibt Doljanski (1973). Danach werden von der Zellmembran laufend Makromoleküle ins Medium abgegeben, die ständig neu nachgebildet werden. Eine hohe Turnoverrate für das freigesetzte Oberflächenmaterial fanden Braun (1971) und Cone et al. (1971) sowohl in vivo als auch in vitro. Sogar einfache Waschvorgänge führen zur Abspaltung von Oberflächenkomponenten. Eine Analyse der losgelösten Makromoleküle

ergab die gleiche Zusammensetzung wie das mittels Trypsin abgespaltene Membranmaterial. Von Tumorzellen freigesetztes Material könnte eine wichtige Rolle bei immunologischen Vorgängen spielen und allgemein für das besondere Verhalten der Tumorzellen mitverantwortlich sein.

Im Einklang mit den Befunden über den flüssigen und dynamischen Zustand einer Membran steht das von Singer und Nicolson (1972) entwickelte "Fluid Mosaic Modell". Danach bilden Phospholipide unterschiedlicher Zusammensetzung eine diskontinuierliche, flüssig-kristalline Doppelschicht, deren Phasenzustand u. a. von der Temperatur, der Kettenlänge und dem Sättigungsgrad der Fettsäuren abhängt. In dieser Lipidlösung sind globuläre Proteine in mosaikartiger Anordnung integriert. Die Proteine liegen ebenfalls in flüssigem Zustand vor, d. h. sie besitzen eine hohe Beweglichkeit parallel zur Oberfläche. Sie können sich entweder nur an einer Membranseite befinden oder sie können teilweise bzw. sogar völlig die Doppellipidschicht durchdringen, sodaß Anteile eines Proteins auf beiden Membranseiten vorhanden sein können (Bretscher, 1971). Dabei sind die polaren Proteinbestandteile nach außen, ihre hydrophoben Reste dagegen ins Membraninnere gerichtet. Eine zusätzliche Asymmetrie der Membran ergibt sich durch die Verteilung der dritten größeren Membrankomponente, der Oligosaccharide, die ausschließlich an der Membranaußenseite auftreten sollen (Drysdale et al., 1968; Poretz und Goldstein, 1970; Nicolson und Singer, 1971; Bretscher, 1972).

Obwohl das "Fluid Mosaic-Membran-Modell" mit einer Anzahl von Ergebnissen gute Übereinstimmung zeitigt, bleiben doch auch weiterhin Fragen offen. Die Einwirkung von Concanavalin A auf Tumorzellen z. B., die als Ansammlung spezifischer Rezeptoren in bestimmten Membranbereichen gedeutet wird, wodurch es zur Bindung kommt, sollte auf eine hohe Beweglichkeit der Membranbestandteile, d. h. auf "größere Flüssigkeit" der Tumor-

zellenmembran schließen lassen. Demgegenüber steht der Befund von Yau und Weber (1972), wonach transformierte Fibroblasten einen geringeren Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren aufweisen, was aber einen geringeren Grad der flüssigen Phase zur Folge haben sollte.

2. Funktion der Membranbestandteile

Über die Funktionen der Membranbestandteile Proteine, Lipide und Polysaccharide lassen sich bisher nur vorläufige Aussagen machen.

Lipide bilden das Fundament der Membran. Sie nehmen in ihrer Doppelschicht mit ca. 50 Å den größten Raum der 80-100 Å dicken Membran ein. Auf Grund ihrer lipophilen Natur, ihres flüssigkeitsähnlichen Charakters und der Möglichkeit von Phasenumwandlungen sind sie maßgeblich für den Grad der Permeabilität verantwortlich (van Deenen, 1968; Träuble, 1971; Lee et al., 1973).

Bei den Proteinen muß man zwischen integralen und peripheren Bestandteilen der Membran unterscheiden (Singer und Nicolson, 1972). Periphere Proteine sind nur locker, vielleicht durch elektrostatische Wechselwirkung an die Membran gebunden und können deshalb leicht abgelöst werden. Möglicherweise sind sie mit den proteinhaltigen Makromolekülen identisch, die ständig ins Medium abgegeben werden (Doljanski, 1973). Als integrale Bestandteile der Membran scheinen die Proteine vorwiegend mit 3 Aufgaben betraut zu sein:

1. sind sie möglicherweise als Strukturproteine am Aufbau der Membran beteiligt,
2. übernehmen sie als "Carrier" Transportfunktionen,
3. haben sie als Membranenzyme hohe Bedeutung (Eylar, 1965; Groß, 1971; Kaplan und Criddle, 1971; Guidotti, 1972).

3. Coat, Glykocalyx

Die Funktionen des mengenmäßig kleinsten Bestandteils,

der Kohlenhydrate, erscheint am vielschichtigsten und am interessantesten. Wie die Membranproteine kann man auch die Membranzucker in gebundene Polysaccharide, die als integrierte Bestandteile in den Glykoproteinen und in den Glykolipiden auftreten, und in freie Polysaccharide, die nur lose gebunden sind, einteilen. Während das Auftreten von freien Zuckerkomponenten nur in wenigen Fällen, z. B. bei Zellen des Dünndarms, locus-absondernden Zellen bekannt ist, finden sich gebundene Polysaccharide in allen untersuchten Plasmamembranen (Rambourg et al., 1966; Rambourg und Leblond, 1967; Ito, 1969). Die Zuckerkomponenten sind die äußersten Membranbestandteile und bedecken, wenn auch z. T. nur unvollständig die Membranoberfläche. Zusammen mit den Protein- und Lipidbestandteilen, an die sie gebunden sind, wird diese polysaccharidreiche Schicht allgemein als Coat, Glykocalyx (Bennett, 1963) oder Glykolemm bezeichnet. Im einzelnen besteht der Coat aus dem neutralen Zuckern: Galaktose, Mannose, Fucose und wenig Glukose, den Acetylaminozuckern N-Acetylglukosamin und N-Acetylgalaktosamin und den Sialinsäuren N-Acetylneuraminsäure und N-Acetylglukolylsäure (Cook und Stoddart, 1973). Auf Grund seiner hydrophilen Eigenschaft ist der Coat von Wasser, Ionen und geeigneten Molekülen bis zu einer bestimmten Größe leicht durchdringbar. Damit besitzt er einen gewissen Filtereffekt und Ionenaustauschercharakter (Ohkuma und Furuhashi, 1970) und kann mit großer Wahrscheinlichkeit den Zelltransport beeinflussen. Außerdem ist er durch den Gehalt an Sialinsäure Träger von ca. 80% der negativen Ladung der Membranoberfläche und damit in hohem Maß für die elektrophoretische Beweglichkeit der Zelle verantwortlich. Als äußerste Membrankomponente muß er irgendwie am Erkennungsmechanismus zwischen den Zellen, an der gegenseitigen Orientierung der Zellen zueinander und an der Adhäsion beteiligt sein und auf irgendeine Weise die Kontakthormone auslösen. Seine große immunologische Bedeutung hat

sich der Tatsache entnehmen, daß spezifische Oberflächen-antigene aus Glykoprotein (z. B. das M-, N- und Histo-kompatibilitätsantigen) und aus Glykolipid (z. B. das A-, B-, H-, und Lewis- Antigen) bestehen, d. h. ebenfalls aus Coatmaterial. Auch die Rezeptoren für die Pflanzen-Agglutinine sind Bestandteile des Coats (Winzler, 1970).

Auf Grund seiner vielfältigen Eigenschaften war und ist der Coat das Objekt intensiver Forschung. Seine polysaccharidhaltigen Bestandteile gestatten das Anfärben mit unterschiedlichen Reagenzien, u. a. mit dem Hale-Reagenz (Gasic und Berwick, 1962), dem Perjodsäure-Schiff'schen Reagenz (Gasic und Gasic, 1962), mit polykationischen Kolloiden des Eisens (Benedetti und Emmelot, 1967), Lanthans und Thoriums (Revel, 1964), mit kolloidalem Rutheniumrot (Luft, 1964) und Alkianblau (Behnke, 1968) und mit Osmiumtetroxyd (Luft, 1971).

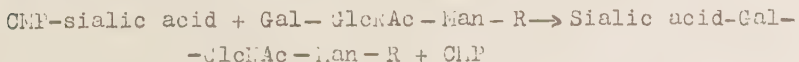
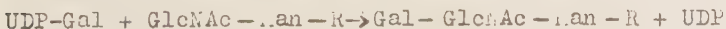
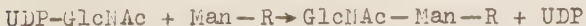
Die anschließende Untersuchung mittels des Licht- und des Elektronenmikroskops ermöglichte Bilder mit einem Auflösungsvermögen bis 300 Å und 100 Å. Veränderte Techniken der Probenzubereitung (Gefrierätzung, Herstellung von Abdrücken) ließen mit Hilfe des Elektronenmikroskops Bilder mit einem Auflösungsvermögen von ca. 20 Å zu. Ihre Auswertung führte zu dem Ergebnis, daß die Polysaccharidketten in ihrer natürlichen wässrigen Umgebung von der Zelloberfläche weg in den freien Raum ragen, und daß z. B. die Sialinsäure, eine endständige Gruppe der Polysaccharidketten auf diese Weise ungefähr 300 Å von der Membranoberfläche entfernt ist. Die Trocknung der Zelle oder der Membran, die meistens bei der Darstellung der Proben für die Elektronenmikroskopie erfolgt, führt zu der Anlagerung der Zuckerketten auf der Membran (Parsons und Subject, 1972).

Zur Isolierung von Coatmaterial wurden Proteasen und Mucinasen wie Trypsin, Pankreatin, Pepsin und Neuraminidase auf Zellen oder Membranen eingesetzt. Dabei spalteten die

Enzyme jeweils unterschiedliche Mengen von zuckerhaltigen Oberflächenbestandteilen ab, währenddessen die Lebensfähigkeit der Zellen kaum beeinträchtigt wurde. Anschließend kann die Glykocalyx, wenn auch nicht im ursprünglichen Zustand wiederhergestellt werden und zwar durch 1-2 Stunden Inkubation in Eagle's Medium mit 10% Zusatz von fötalem Rinderserum (Gasic und Gasic, 1962; Mallucci et al., 1972).

Zur Klärung der Biosynthese des Coats wurde eine Reihe von Incorporationsversuchen mit radioaktiv-markierten Bausteinen des Coats unternommen, so z. B. mit ^3H - bzw. ^{14}C -Fucose, Galaktose, Mannose, Sialinsäure und Glukosamin (Onodera und Sheinin, 1970; Gerner et al., 1970; Reith et al., 1970; Bennett und Leblond, 1970; Bennett, 1970; Bennett und Leblond, 1971).

Die Auswertung mittels Autoradiographie und die Trennung in einzelne Zellfraktionen deckte am Beispiel der Fucose folgenden Ablauf auf: Zunächst erfolgte rascher Einbau in die Zelle und zwar in die Golgiapparate, während im Coat nur wenig markierte Substanz gefunden wurde. Nach einigen Stunden reicherte sich die Fucose im Coat an, während die Markierung in den Golgiapparaten abnahm. Offenbar wird die Glykocalyx in den Golgiapparaten gebildet und nicht von der Plasmamembran abgesondert (Bennett und Leblond, 1970, 1971). Die Synthese soll in Form eines Glykoproteins bzw. Glykolipids erfolgen, wobei die Polysaccharidkette mittels eines komplexen Systems von Glykosyltransferasen aufgebaut wird. Die Zuckerkette beginnt häufig mit N-Acetylgalaktosamin, das O-glykosidisch an ein Serin- oder Threoninmolekül des Peptidrestes gebunden ist. Nach Schachter et al. (1970) soll der Einbau der drei letzten Kettenglieder im Polysaccharidrest nach folgendem Schema ablaufen:



Das entstandene Glykoprotein bzw. Glykolipid wird dann extrazellulär mosaikartig an die Membran angelagert. Bei Tumorzellen fand man häufig eine unvollständige Ausbildung der Polysaccharidketten.

Tumorzellen unterscheiden sich von normalen Zellen, wie beschrieben, durch eine Anzahl von wesentlichen Merkmalen. Es zeigte sich, daß ein Großteil dieser Besonderheiten auf den Charakter der Membran bzw. der Glykocalyx zurückzuführen ist. Beabsichtigt man also, Eigenheiten von Tumorzellen zu beobachten und möglicherweise zu beeinflussen, so erscheint es erfolgversprechend, auf Tumorzellen einen Stoff einwirken zu lassen, der oberflächenaktive Eigenschaften besitzt. Aus diesem Grund fiel die Wahl auf das bereits in geringer Konzentration hochwirksame Saponin Äscin (Hein, 1971).

IV. Das Saponin Äscin

1. Struktur des Äscins

Äscin ist keine chemisch einheitliche Substanz, sondern wie aus zahlreichen Strukturuntersuchungen (Tschesche et al., 1963; Hoppe et al., 1968; Wagner et al., 1968; Wulff und Tschesche, 1969; Wagner et al., 1970a, 1970b) hervorgeht, ein komplexes Gemisch, dessen Einzelverbindungen ein gemeinsames Bauprinzip zu Grunde liegt. Der Grundkörper besteht aus einem pentazyklischen (3, 16, 21, 22, 28) Pentahydroxy- (Barringtonenol C) bzw. (3, 16, 21, 22, 24, 28) Hexahydroxytriterpen (Protoäscigenin). Die Hydroxygruppe am C₂₁ ist vorwiegend mit Tiglinsäure bzw. der dazu tautomeren Angelikasäure, diejenige am C₂₂ mit Essigsäure verestert. Über die OH-Gruppe am C₃ ist eine D-Glukuronsäure gebunden, die in 2- und 4-Stellung durch 2 Moleküle Glukose substituiert ist (Abb. 2).

Durch die Tatsache, daß im Äscin zwei Grundkörper, Protoäscigenin und Barringtonenol C vorliegen, ferner ein Molekül Glukose durch Galaktose oder Xylose ersetzt sein kann und überdies an Stelle der Tiglin- bzw. Angelikasäure auch α -Methylbuttersäure und Isobuttersäure auftreten können, ergibt sich eine große Anzahl von Varianten, die nur schwer voneinander trennbar sind und in ihrem chemischen, pharmakologischen Verhalten kaum Unterschiede aufweisen. Neben dem Vorkommen von Äscinvarianten unterschiedlicher chemischer Zusammensetzung, gibt es beim Äscin überdies die Erscheinung der Stellungsisomerie. "Äscine", wie das α -Äscin, das β -Äscin und das Kryptoäscin A sind Bestandteile, die sich weder im Rf-wert, noch in der Elementaranalyse, noch in den Bruchstücken nach saurer bzw. alkalischer Hydrolyse unterscheiden, aber in der Wasserlöslichkeit, im Kristallisationsvermögen, im optischen Drehwert und in der hämolytischen Aktivität charakteristische Eigenheiten aufweisen. Untersuchungen von Wagner et al. (1970) und Löw (1967) zeigten, daß β -Äscin und Kryptoäscin A sich nur durch die Stellung der Acetylgruppe am Aglykon unterscheiden, die beim β -Äscin

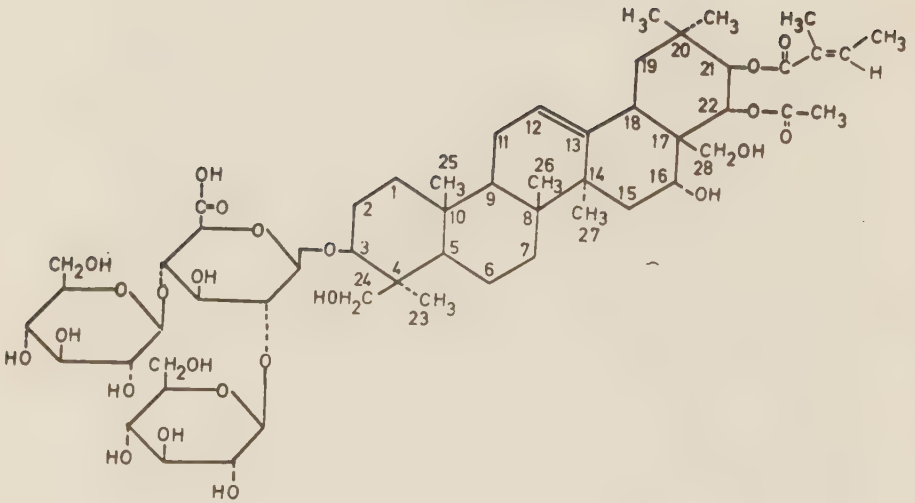


Abb. 2:

Hauptglycosid des β -Ascins: 3-[2'-(β -D-gluco-pyranosido)-4'-(β -D-gluco-pyranosido)- β -D-glucurono-pyranosido]-21 β -tigloyl, 22 α -acetyl-protoäscigenin

an der Hydroxylgruppe des C_{22} gebunden ist, beim Kryptoäscin A dagegen am C_{28} . Unter Isomerisierungsbedingungen kann eine Wanderung der Essigsäure zwischen C_{22} und C_{28} erfolgen.

Die Strukturverhältnisse beim α -Äscin sind bisher nicht völlig geklärt. Einerseits liegen beim α -Äscin die beiden Stellungsisomeren β -Äscin und Kryptoäscin A bezüglich ihrer Acylglykonstruktur im stabilen Gleichgewicht vor (Wagner et al., 1970b), andererseits zeigt α -Äscin nicht dieselben Eigenschaften wie eine entsprechende Mischung aus β -Äscin und Kryptoäscin A.

Zieht man für die beiden Stellungsisomeren β -Äscin und Kryptoäscin A die Möglichkeit in Betracht, daß alle Varianten unterschiedlicher chemischer Zusammensetzung auftreten können, so kommt man für das Gemisch Äscin auf eine theoretische Anzahl von 48 möglichen Kombinationen, wobei α -Äscin noch unberücksichtigt bleibt. Die möglichen Komponenten sind aber nicht in gleicher Größenordnung vorhanden, sondern nach Wulff und Tschesche (1969) ergeben die 8 häufigsten Vertreter bereits ca. 73 % der Gesamtmenge.

2. Pharmakologie des Äscins

Äscin hat seit einigen Jahren in der medizinischen Praxis Eingang gefunden. Ihm werden Ödem-hemmende Wirkung und Gefäßresistenz-erhöhender Effekt zugeschrieben (Lorenz und Marek, 1960; Vogel und Marek, 1962; Vogel et al., 1970; Láhoda, 1971). Zudem wird die Kapillarpermeabilität erhöht, sodaß es zu intra- und extrazellulärer Elektrolytverschiebung kommen kann (Würker, 1969). In Tierversuchen wurde Äscin je nach Tierspezies in Dosen von 0,5 - 2 mg/kg i. v. appliziert, während bei oraler Applikation die 10 - 20fache Dosis zur Erzielung des gleichen Effektes benötigt wurde.

Über die pharmakologische und toxikologische Wirkung der einzelnen Äscinisomere auf verschiedene Tierspezies berichteten Vogel und Uebel (1960), Uebel und Patt (1960)

und Hampel et al. (1970). Danach zeigen sich nur qualitative Unterschiede in der Hemmung unterschiedlich provozierter Ödeme, in der Steigerung der Wasser- und Salzausscheidung und in der Normalisierung gestörter Gefäßpermeabilität. Über den Wirkungsmechanismus der "Äscine" in vivo ist aber bisher nichts Näheres bekannt (Vogel und Uebel, 1960).

B. PROBLEMSSTELLUNG

Die Absicht der vorliegenden Arbeit ist es, Effekte festzustellen, die durch die Einwirkung des Saponins Ascin auf Yoshida-Ascitestumorzellen *in vitro* verursacht werden. Daneben soll ein Einblick in die Wirkungsweise des Ascins gewonnen werden.

Das Hauptaugenmerk richtet sich wegen des oberflächenaktiven Charakters von Ascin vor allem auf die Membran und die Glykocalyx der Zelle. Insbesondere sind diejenigen Eigenschaften der Zelle von Interesse, die wie in Kapitel A beschrieben, eng mit der Membran verknüpft sind.

Zunächst soll an Hand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Einfluß auf das morphologische Erscheinungsbild der Zelle untersucht werden. Die toxische Wirkung, die dieser Stoff in höheren Dosen *in vivo* zeigt, läßt ebenfalls eine Schädigung und sogar den Tod der Tumorzelle *in vitro* erwarten. So soll die Lebensfähigkeit von Tumorzellen *in vitro* in Abhängigkeit der Konzentration und der Zeit der Einwirkung von Ascin beobachtet werden.

Da die Behandlung der Zellen mit dem negativ geladenen Ascin eine vorübergehende oder bleibende Anlagerung erwarten läßt, sollten sich daraus Konsequenzen für die Gesamtladung der Membran und damit für die Wanderungsfähigkeit der Zellen im elektrischen Feld einer Elektrofokussiersäule ergeben.

Die mögliche Anlagerung von Ascin an die Zelloberfläche könnte zu einer Besetzung von Rezeptoren oder bestimmten Membranbezirken führen, die für Transportvorgänge wichtig sind. Die Messung des Transports von Nichtelektrolyten und Ionen durch die Tumorzellenmembran soll den Effekt von Ascin charakterisieren. In diesem Zusammenhang soll auch auf die Wirkungen des Saponins eingegangen werden, die beim gänzlich andersgearteten, Insulin-empfindlichen epididymalen Fettgewebe der Ratten zu beobachten sind. Dazu werden Transportvorgänge nach Zusatz von Ascin in

Kombination mit unterschiedlichen Substanzen untersucht.

Der oberflächenaktive Charakter von Äscin läßt überdies auch eine Einflußnahme auf die von Doljanski (1973) beschriebene Abgabe von Makromolekülen ins Medium erwarten. Mittels gravimetrischer und fluorometrischer Methoden sollen Unterschiede im freigesetzten Material gegenüber unbehandelten Kontrollzellen erfaßt werden. Oberflächenbestandteile, die durch Äscin bevorzugt freigesetzt werden und im Vergleich dazu Material, das durch Trypsin oder Neuraminidase abgelöst wird, sollen mittels isoelektrischer Fokussierung und Gelchromatographie aufgetrennt werden. Die einzelnen Fraktionen sollen näher charakterisiert werden.

Schließlich sollen Inkorporationsversuche mit radioaktiven Substanzen darüber Auskunft geben, wie weit die Regenerierung des durch Äscin bevorzugt freigesetzten Materials möglich ist.

C. MATERIAL

I. Substanzen

1. Äscine

Äscin amorphisiert (Dr. Madaus, Köln)

Äscin gem. DAS 1276295 (Dr. Madaus, Köln)

³H-Dihydro- β -Äscin (Prof. Henschler, Prof. Hempel)

α -Äscin und β -Äscin (hergestellt nach Wagner und
Bosse, 1960)

Äscinol (Wagner und Bosse, 1960)

Äscigenin (nach Kuhn und Löw, 1963)

Dihydroäscin (katalytisch hydriert)

2. Radioaktive Substanzen

1-¹⁴C-Glukose (2,8-2,9 m Ci/mmol)

1-¹⁴C-Glycin (55 mCi/mmol)

1-¹⁴C- α -Amino-isobuttersäure (58 mCi/mmol)

(U)-¹⁴C-L-Leucin (311 mCi/mmol)

(U)-¹⁴C-L-Fucose (133 mCi/mmol)

1-¹⁴C-D-Glukosaminhydrochlorid (3,0 mCi/mmol)

4,5,6,7,8,9-¹⁴C-N-Acetylneuraminsäure (270 mCi/mmol)

1-¹⁴C-L-Fucose (52 mCi/mmol; CALBIOCHEM., Luzern)

Soweit nicht anders angegeben, wurden die radio-
aktiven Substanzen vom Radiochemical Centre, Amersham,
England, bezogen.

3. Enzyme, Hormone, Proteine

Neuraminidase (Sigma, St. Louis, USA)

Trypsin (Boehringer, Mannheim)

Trypsin-Inhibitor (Boehringer, Mannheim)

Papain (Merck, Darmstadt)

Phospholipase D (Boehringer, Mannheim)

Concanavalin A (Boehringer, Mannheim)

Valinomycin (Sigma, St. Louis, USA)

Serumalbumin vom Rind (Behringwerke, Marburg)

Insulin (Kristallinsulin) (Hoechst, Frankfurt)
Insulin (Glukagonfrei; 11 x umkristallisiert, vom
Schwein) (Novo Industrie, Mainz)
Dexamethason (Sigma, St. Louis, USA)
Wachstumshormon (Sigma, St. Louis, USA)

4. Weitere Chemikalien

Glukoseoxydase Testsatz (Boehringer, Mannheim)
Ampholine (LKB-Produkte, Bromma, Schweden)
Sephadex G25 fine (Pharmacia, Uppsala, Schweden)
8-Anilino-naphthalin-1-sulfonsäure (Sigma, St. Louis)
N-Acetylneuraminsäure (Sigma, St. Louis, USA)
Hyamin (p-Diisobutyl-cresoxyäthoxyäthyl- dimethyl-
benzylammoniumhydroxyd)
(Packard Instruments, Frankfurt)
3-O-Methylglukose (CALBIOCHEM., Luzern)
ß-Mercaptoäthanol (Roth, Karlsruhe)
Folin-Ciocalteus Phenolreagenz (Merck, Darmstadt)
Anthrone (Merck, Darmstadt)
Inulin (Merck, Darmstadt)
Dimedon (Merck, Darmstadt)
D-Mannit (Merck, Darmstadt)
Thiobarbitursäure (Merck, Darmstadt)
Cyclohexanon (Merck, Darmstadt)

Der Firma Dr. Madaus und der Firma Novo, sowie
Herrn Prof. Henschler und Herrn Prof. Hempel sei
für überlassenes Material gedankt.

II. Medien

1. Krebs-Henseleit Bicarbonatmedium

KCl	46,0 mg
CaCl ₂ x 2H ₂ O	48,4 mg
MgSO ₄ x 7H ₂ O	38,2 mg
KH ₂ PO ₄	21,1 mg
NaCl	900,0 mg

Die Substanzen wurden in 90 ml H_2O gelöst und unter Eiskühlung mit Carbogen begast. Außerdem wurden 273 mg $NaHCO_3$ in 40 ml H_2O gelöst und ebenfalls mit Carbogen begast. Vor Versuchsbeginn wurden die beiden Lösungen vereinigt.

(Carbogen = 95% O_2 , 5% CO_2)

2. Krebs-Ringer Phosphat-Puffer

100 ml 0,90% NaCl-Lösung
4 ml 1,15% KCl-Lösung
3 ml 1,22% $CaCl_2 \times 2H_2O$ -Lösung
1 ml 2,11% KH_2PO_4 -Lösung
1 ml 3,82% $MgSO_4 \times 7H_2O$ -Lösung
12 ml 0,1 m Phosphatpuffer pH 7,4 (17,8 g $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ + 20 ml 1 n HCl auf 1 Ltr. aufgefüllt)

Das Medium wurde mit Tris (hydroxymethyl) amino-methan (=Tris) auf den pH-Wert von 7,35 eingestellt.

3. Mannitmedium

Mannit 228 mM (8,32 g)
NaCl 10 mM (233,6 mg)
KCl 10 mM (149 mg)
 $CaCl_2 \times 2H_2O$ 10 mM (294 mg)

Die Substanzen wurden in 200 ml H_2O gelöst. Anschließend wurde das Medium mit "Tris" auf den pH-Wert von 7,35 eingestellt.

III. Szintillationsgemische

1. Szintillatortoluol

4 g PPO (2,5-Diphenyl-oxazol)
100 mg POPOP (1,4-Bis-2-(4-methyl-5-phenyloxazolyl)-benzol)
1 Ltr. Toluol

2. Szintillatordioxan (Bray, 1960)

300 g Naphthalin
20 g PPO
1 g Dimethyl-POPOP
500 ml Methanol
100 ml Äthylenglykol
mit Dioxan auf 5 Liter aufgefüllt

IV. Darstellung von verschiedenen "Äscinen" und Äscinderivaten

1. α -Äscin und β -Äscin

α -Äscin und β -Äscin wurden nach Angaben von Wagner und Bosse (1960) hergestellt. Dazu wurde 1 g röntgenamorphes Äscin in H_2O gelöst und 3 min. auf $60^\circ C$ erwärmt. Dabei fiel schwer lösliches β -Äscin aus, während die α -Äscin-haltige Fraktion in Lösung blieb. Durch Trocknung des Niederschlags, Gefrier-trocknung der Lösung und Umkristallisieren der beiden Rohprodukte erhielt man α -Äscin (114 mg 15%) und β -Äscin (683 mg 85%).

2. Äscinol

Die alkalische Hydrolyse von Äscin, die zur Abspaltung der Säurekomponenten führte, wurde ebenfalls nach Wagner und Bosse (1960) durchgeführt. 5 g Äscin wurden in 125 ml H_2O und 25 ml 4%iger NaOH 1 Stunde unter Rückfluß gekocht. Es wurde noch heiß filtriert, dann abzentrifugiert, säurefrei gewaschen und anschließend getrocknet. Das Rohprodukt wurde in 100 ml Methanol gelöst und mit Aktivkohle gereinigt. Nach Abzentrifugieren der Kohle wurde das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen. Die Ausbeute des fett-säurefreien Produkts betrug 4,1 g.

3. Äscigenin bzw. Protoäscigenin

Nach Angaben von Kuhn und Löw (1963) wurde der Grundkörper der Äscine, das Äscigenin durch saure und anschließend alkalische Hydrolyse gewonnen. 5 g Äscin wurden in 80 ml Äthanol und 80 ml 4 N HCl 2 Stunden unter Rückfluß gekocht. Nach Verdünnen mit H_2O , Abdestillieren eines Teils der Flüssigkeit und nochmaligen Verdünnen fiel ein unlösliches Produkt aus, das mehrmals mit H_2O gewaschen wurde. Die vollständige Entacylierung wurde durch 1h-Erhitzen mit 100 ml 5% methanolischer KOH erreicht. Mit H_2O wurde verdünnt und durch Abdestillieren eines Teils der Flüssigkeit wieder eingengt. Der Niederschlag wurde mehrmals mit H_2O gewaschen. Da das anfallende Rohprodukt sich als schwer wasserlöslich und damit für die Versuche in wässrigem Medium als unbrauchbar erwies, wurde auf eine weitere Reinigung verzichtet. Die Ausbeute betrug 2,0 g Äscigenin.

4. Dihydroäscin

Die katalytische Hydrierung von Äscin wurde analog einer Arbeitsvorschrift von Gattermann und Wieland (1962) durchgeführt. In der Hydrierbirne, einer mit Wasserstoff gefüllten Hydrierungsapparatur, in der sich Platinoxid als Katalysator befand, wurden 5 g Äscin in 100 ml Methanol gelöst. Nach Vertreiben eventuell vorhandener Luft durch Durchleiten von H_2 wurde der Hydrierungsvorgang bei Zimmertemperatur durch Schütteln in Gang gesetzt. Nach 3 Stunden wurde der Prozeß unterbrochen, der Katalysator abfiltriert und mit Lösungsmitteln nachgewaschen. Durch Verdünnen mit H_2O , Abziehen eines Teils des Lösungsmittels und erneutem Verdünnen wurde ein hydriertes Produkt in Form von Kristallinen,

glänzenden Blättchen erhalten. Nach Henschler et al. (1971) erfolgt die Hydrierung an der Doppelbindung der Tiglin- bzw. Angelikasäure.

5. Einige physikalische Eigenschaften der Äscine

Zur näheren Charakterisierung der einzelnen Substanzen wurden der Schmelzpunkt (Kofler-Heiztisch-Mikroskop, Fa. Reichert, Wien) und das Absorptionsvermögen im UV-Bereich der in Methanol gelösten Stoffe festgestellt (Registrierendes Spektralphotometer DMR 21, Zeiss). In Tabelle 1 sind die Ergebnisse zusammengefaßt. Die Absorptionsmaxima aller Äscine liegen zwischen 204 und 208 nm. Die Schmelzpunkte von Äscin (amorph.), α -Äscin, β -Äscin und Äscinol unterscheiden sich nur wenig. Allein die Schmelzpunkte von Äscigenin und dargestelltem, hydriertem Äscin liegen merklich höher.

Zur Klärung, ob zwischen Äscin und Cholesterin, bzw. zwischen Äscin und Lecithin beständige Anlagerungsverbindungen auftreten können, wurden diese Substanzen einzeln und kombiniert auf Dünnschichtplatten (Kieselgel G) aufgetragen. Als Laufmittel diente für Äscin und Cholesterin Butanol-Äthanol-Wasser (10, 2, 5 Teile). Die Detektion erfolgte mit cc H_2SO_4 und anschließend 10 min. Erhitzen auf 110°C . Die Rf-Werte betrugen für Äscin 0,26 und für Cholesterin 0,97.

Als Laufmittel für Äscin und Lecithin wurde Chloroform-Methanol-Wasser (65-25-4) verwendet. Mit 5% $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ -Lösung in 40% H_2SO_4 wurde die Detektion durchgeführt. Als Rf-Werte ergaben sich für Äscin 0,10 und für Lecithin 0,34.

Die Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie zeigten deutlich, daß Äscin getrennt von Cholesterin und Lecithin wandert und somit keine starke Bindung zwischen dem Saponin und diesen beiden Membrankomponenten vorliegen kann.

Tabelle 1:

Schmelzpunkte und Wellenlängen der Absorptionsmaxima
der einzelnen Äscine

	Smp _{gef.} (°C)	Smp _{Lit.} (°C)	λ (nm)
Äscin(amorph.)	.	224/5	208
β -Äscin	224/5	222/3	206
α -Äscin	226/8	225/7	207
Äscinol	229/31	230/1	206 ,
Äscigenin	(Rohprodukt)	317/8	207
hydr. Äscin	252/5	226/8	204

Smp_{gef.} = Schmelzpunkt gefunden

Smp_{Lit.} = Schmelzpunkt nach Literatur

V. Tiere, Zellen und Gewebe

Für die Untersuchungen wurden weibliche NMRI-Mäuse (18 - 23 g) und männliche Wistarratten (140 - 180 g) verwendet. Die Tiere wurden von den Zuchtstationen Schwencke (Bad Nauheim) und Hagemann (Extertal) bezogen. Als Nahrung diente Altromin R-Trockenfutter (Altromin GmbH, Lage Lippe) und Leitungswasser.

Für die Fettgewebsversuche wurden die epididymalen Fettgewebsschleier dekapitierter männlicher Ratten isoliert.

Die Ascitestumorzellen eines seit mehreren Jahren an Mäuse adaptierten Yoshida-Sarkoms stammten aus dem Institut für Klinische Chemie im Klinikum Steglitz. Für ihre Überlassung sei Herrn Prof. Dr. Liss gedankt.

D. Versuchsanordnungen und ihre theoretischen Grundlagen

I. Fettgewebsversuche

Auf jeweils 24 - 36 25ml-Erlenmeyerkölbchen wurden ca. 150 mg zerkleinerte Fettgewebsschleier anteilig zugesetzt. Die Inkubationen erfolgten im Wasser-schüttelbad bei 37° C in Krebs-Henseleit-Bicarbonat-medium, das mit Carbogen begast war. Am Ende eines Versuchs wurden die Gewebstückchen gesammelt, mit Filterpapier vom anhaftenden Medium befreit und gewogen. Das Feuchtgewicht diente als Bezugsgröße.

Transportvorgänge:

Die Aufgabe des transmembranen Transports besteht in der Zufuhr von Substanzen für den Bau-, Betriebs- und Funktionsstoffwechsel der Zelle und in der Eliminierung von Stoffwechselprodukten. Der Transportvorgang kann durch freie Diffusion, erleichterte Diffusion oder aktiven Transport erfolgen.

Mittels freier Diffusion können nur wenige niedermolekulare Stoffe, neben Wasser ein- und mehrwertige Alkohole, Säureamide und Harnstoff in die Zelle penetrieren. Die Triebkraft der Permeation ist allein das Konzentrationsgefälle oder das elektrochemische Potential der Teilchen auf beiden Membran-seiten.

Bei der erleichterten Diffusion (facilitated diffusion), die sich durch hohe Substratspezifität auszeichnet, ist mit dem zelleinwärts gerichteten Fluß (influx) gleichzeitig ein zellauswärts gerichteter Transfer (efflux) verbunden. Auf diese Weise kann ohne unmittelbar gekoppelte Stoffwechselvorgänge ein Substrat entgegen seinem Konzentrationsgefälle in der Zelle angereichert werden. Wenn auch der Gesamt Ablauf Energie erfordert, so ist doch der

eigentliche Transport energieunabhängig. Kaback und Stadtman (1968) zeigten dies an dem Glycintransport durch isolierte Membranpräparate von *E. coli*. Der aktive Transport beinhaltet die Fähigkeit der Zelle, Substanzen entgegen ihrem Konzentrationsgefälle unter Energieaufwand durch die Membran zu pumpen. Der Fluß von Ionen und Nichtelektrolyten ist mit einer in der Transportregion ablaufenden chemischen Reaktion bzw. mit der bei dieser Reaktion freiwerdenden Energie direkt gekoppelt.

1. Der Transport von Aminosäuren

Der Transport einer Aminosäure ins Fettgewebe kann durch deren Abnahme im Inkubationsmedium, durch den Einstrom ins Gewebe oder, bei verstoffwechselbaren Aminosäuren, durch die Umwandlung von Fettsäuren (Feller und Feist, 1959) und die CO_2 -Bildung beim oxydativen Abbau bestimmt werden. Die Richtung dieser einzelnen Merkmale verläuft nicht immer gleichsinnig, sondern hängt von der jeweiligen Aminosäure und den Inkubationsbedingungen ab. Eine besondere Rolle dürfte die Mindestmenge einer energiereichen Substanz, z.B. Glukose spielen, ohne die der Aminosäureumsatz merklich zurückgeht und die u.a. zur Stimulierung des Transports durch Insulin unbedingt erforderlich ist. Einzelheiten über Modelle des Aminosäuretransports werden am Beispiel der Ehrlich-Ascitestumorzellen in einem späteren Kapitel ausgeführt.

a. Der Einstrom von α -Aminoisobuttersäure (α -AiB)

Die Versuchsansätze enthalten das Fettgewebe in 3 ml Medium mit Zusatz von Glukose (300 μ /ml) und Insulin (6 mg/ml). Nach Erwärmen auf die Versuchstemperatur von 37°C wurde 1- ^{14}C - α -AiB und Ascin zugesetzt.

Nach 2 Stunden Inkubationsdauer wurden die Proben in Eis gestellt, wodurch die Aminosäureaufnahme ins Fettgewebe abgestoppt wurde. Der Wägung des

Feuchtgewichts schloß sich die Messung der Radioaktivität und die Bestimmung der Inulinkonzentration im Medium wie im Gewebe an. Zur Vorbereitung der Radioaktivitätsmessung wurden 100 μ l Medium je Probe in Zählgefäße überführt, die ein Gemisch von 8 ml Szintillator-toluol und 4 ml Äthanol enthielten.

Zur Untersuchung der Radioaktivität im Fettgewebe wurde die eine Hälfte des Gewebes in Zählgefäßen bei 60°C in 4 Stunden getrocknet, in 0,5 ml 10% NaOH bei 60°C aufgelöst und mit 7 ml Szintillator-toluol und 5 ml Äthanol versetzt.

Die Messung der einzelnen Proben erfolgte in dem Tri-carb-Liquid-Scintillations-Spectrometer Modell 3375 und Modell 3380 (Packard Instruments, Frankfurt).

Inulinbestimmung

Zur Ermittlung des Inulingehalts im Medium wurden jeweils 100 μ l der 1:10 verdünnten Proben angesetzt. Außerdem wurde die unbekannte Inulinmenge bestimmt, die sich in den extrazellulären Zellzwischenräumen des Fettgewebes befindet. Dazu wurde die 2. Hälfte des mit Filterpapier vom Inkubationsmedium befreiten Fettgewebes in 500 μ l frisches Medium gebracht und intensiv geschwenkt. Der Inulingehalt von 100 μ l dieser Lösung wurde ermittelt.

Die einzelnen 100 μ l Proben wurden jeweils mit 2 ml Dimedonreagenz (1 g Dimedon in 100 ml cc H_3PO_4 gelöst) versetzt und 5-8 min. in ein siedendes Wasserbad gestellt.

Nach Abkühlen wurde die Extinktion bei 455 nm gemessen.

Berechnung des Aminosäuregesamtraums (TCR) und des Intrazellulärtraums (ICR)

Mittels der Radioaktivität der Aminosäure, die in 100 μ l Medium enthalten ist und die als Bezugswert dient, läßt sich aus dem radioaktiven Gehalt der

Zellen der TCR berechnen, der sich aus intra- und extrazellulären Anteilen zusammensetzt.

Der Zusatz von Inulin ermöglicht die Ermittlung des extrazellulären Anteils des TCR. Denn da Inulin nach unseren Kenntnissen nicht von der Zelle aufgenommen wird, kann man aus der Konzentration des Inulins, das man in den Gewebeproben findet, auf die Menge des anhaftenden Mediums und die darin befindliche extrazelluläre Radioaktivität schließen.

Aus der Differenz des TCR und des ECR erhält man den ICR, eine hypothetische Größe. Dieser Raum würde im Zellinnern existieren, wenn die Voraussetzung gleicher intra- und extrazellulärer Aminosäurenkonzentration erfüllt wäre. Da diese Annahme nicht zutrifft, bedeutet eine Erhöhung bzw. Erniedrigung des ICR gegenüber dem wahren intrazellulären Raum meist eine Anreicherung bzw. verminderte Aufnahme der betreffenden Substanz.

b. Aufnahme von Glycin

Die Aufnahme der metabolisierbaren Aminosäure Glycin wurde indirekt aus dem radioaktiv-markierten CO_2 bestimmt, das beim $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glycinstoffwechsel entsteht. Zur Aufnahme des Fettgewebes diente wie oben 3 bzw. 4 ml Medium ohne Zusätze in 25 ml Erlenmeyerkölbchen. Die Kolben, in die kleine Glasgefäße eingehängt waren, wurden mit Gummikappen verschlossen und in ein H_2O -Bad gebracht. Nach Temperierung auf 37°C wurde durch Zugabe von ^{14}C -Glycin und Äscin die Reaktion gestartet.

Am Ende der 2 Stunden-Inkubation wurde in die eingehängten Gläschen 0,4 ml der starken Base Hyamin gespritzt, während gleichzeitig in das Medium 0,2 ml 10% H_2SO_4 injiziert wurde, um das $^{14}\text{CO}_2$ das sich in der 2 Stunden-Inkubation aus $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glycin gebildet hatte, während einer zweiten 45 min. Inkubation aus-

zutreiben und durch Hyamin zu absorbieren.

Die Hyaminproben wurden in Zählgefäße mit 10 ml Szintillatortoluol gebracht und die enthaltene Radioaktivität im "Tricarb" gemessen.

c. Aufnahme von L-Leucin ($U-^{14}C$)

Der Transport in die Zelle und die $^{14}CO_2$ -Bildung wurden in derselben Versuchsanordnung wie Glycin bestimmt. Die Auswertung erfolgte in analoger Weise.

2. Glukosetransport

Wie bei dem Aminosäuretransfer in die Zelle kann man auch bei dem Glukosetransfer aktiven Transport und erleichterte Diffusion unterscheiden. Aktiver, Na^+ -abhängiger Transport liegt vor z. B. in Darmepithelzellen (Crane, 1962, 1965; Csáky, 1963) und in Epithelzellen von Nierentubuli (Loeschke, 1969; Lefevre, 1972; Baumann und Kinne, 1972). Es liegen viele Befunde vor, daß die Aufnahme der Glukose zusammen mit Na^+ und einem Carrier als ternärer Komplex erfolgt. Bei diesem Vorgang wird der Transfer des einen Partners durch den anderen beschleunigt (Schultz und Zalusky, 1965).

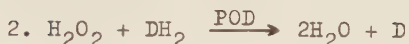
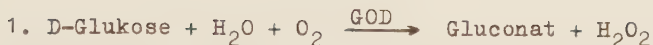
Bei den meisten Zellarten erfolgt der Zuckertransport jedoch durch erleichterte Diffusion. Auch für diesen Vorgang wird allgemein ein Carriersystem diskutiert. Daneben verdienen weitere Transportmodelle Beachtung, die auf eine Carrierbasis verzichten und dafür die Hypothese von wassergefüllten Poren bzw. Proteinkanälen in der Membran zur Grundlage haben (Naftalin, 1970; Lieb und Stein, 1970, 1971, 1972).

Bei den Zellen, bei denen der Glukosetransport durch erleichterte Diffusion stattfindet, lassen sich 2 Gruppen unterscheiden: Insulin-empfindliche Zellen wie z. B.

Muskelzellen (Levine, 1949, 1950; Wohltmann und Nara-hara, 1966; Gould und Chaudry, 1970a, 1970b) und Fett-gewebszellen (Winegrad und Renold, 1958; Cuatrecasas, 1971a) und Insulin-unempfindliche Zellen wie z. B. Erythrocyten (Lefevre, 1961; Ashmore und Weber, 1968). Die Wahrscheinlichkeit, daß Insulin auf eine Zellart einwirkt, ist nach Cuatrecasas (1969, 1971a, 1972a) an Insulin-spezifische Rezeptoren an der Membranober-fläche geknüpft. Durch kurzzeitiges Einwirken von Phospholipase A, Phospholipase C, Neuraminidase und Concanavalin A (Cuatrecasas, 1971b, 1971c, 1972b) läßt sich die maximale Bindungskapazität für Insulin ver-größern oder in begrenztem Umfang auch die Umgebung der Rezeptoren im molekularen Bereich verändern, wo-durch der Insulineinfluß verstärkt wird. Der mögliche Mechanismus der Insulinwirkung könnte aus einem Re-zeptorsystem der Zellmembran bestehen, einem dort er-zeugten ersten Signal, das von einem Transducersystem an ein bzw. mehrere Effektorsysteme vermittelt wird (Avruch und Pohl, 1973). Auf diese Weise sollen die bekannten Insulineffekte, wie die Stimulierung des Transports von Glukose, K^+ und in geringem Maß von Na^+ , die Erhöhung der Synthese von Protein, Glykogen und Nu-cleinsäuren und die Hemmung von Lipolyse erzeugt werden.

Aufnahme von Glukose

Der Versuchsablauf für den Transport von $1-^{14}C$ -Glukose verlief analog zu jenem von $1-^{14}C$ -Glycin. Im Inkubations-medium befanden sich neben der $1-^{14}C$ -Glukose ($0,1 \mu Ci/3$ bzw. $0,1 \mu Ci/4 ml$) $5 \mu mol$ nicht markierter Glukose. Ne-ben der $^{14}CO_2$ -Messung, die sowohl den Transport durch die Membran als auch den intrazellulären Glukoseabbau vorwie-gend über den Pentosephosphatzzyklus beinhaltet, wurde auch die Glukoseabnahme im Medium ermittelt. Dazu wurde ein Testsatz von Boehringer benutzt, der die Reaktion zweier Enzyme zur Grundlage hat.



GOD = Glukoseoxidase

POD = Peroxidase

DH₂ = Leukofarbstoff Anisidin

D = Farbstoff

D bedeutet die oxidierte, rotfarbene Form von Dianisidin, dessen Extinktion bei 546 nm gemessen wird.

An Stelle von 1-¹⁴C-Glukose wurde in gleicher Meßanordnung der ebenfalls verstoffwechselbare Aminozucker 1-¹⁴C-Glukosamin verwendet, der ähnliche Transporteigenschaften wie Glukose aufweist.

Bei den Versuchen, denen die ¹⁴CO₂-Bildung als Meßgrundlage diente, wurde in vielen Fällen der Einfluß von Äscin mit demjenigen von Insulin verglichen, da dieses Hormon bekanntermaßen die CO₂-Bildung gegenüber Kontrollwerten beträchtlich steigert (Crofford und Renold, 1965). Zur Quantifizierung der Insulinwirkung auf den Glukosetransport wurden Versuche unterschiedlicher Konzentrationen von Kristallinsulin und Glukagon-freiem Insulin durchgeführt.

3. Auswascheffekt, Reversibilität der Äscinbindung an das Fettgewebe

Um festzustellen, wie stark die Bindung von Äscin an das Fettgewebe ist, und ob die Inkubation mit Äscin eventuell eine bleibende Veränderung des Fettgewebes verursacht, wurde das Gewebe bei 37°C 30 min mit Äscin in stimulierenden und hemenden Konzentrationen vorinkubiert.

Danach wurde das Gewebe 2 x in physiologischer NaCl-

Lösung und 1 x in Krebs-Henseleit Medium sorgfältig geschwenkt und mit Filterpapier abgetupft. In einer erneuten Inkubation wurde die $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung aus 1- ^{14}C -Glukose mit und ohne Äscin beobachtet.

4. Kinetische Analyse des Glukosetransports

Zur Charakterisierung der Kinetik des Glukosetransports wurde dem Medium unterschiedliche Glukosekonzentrationen zugesetzt und die zugehörigen CO_2 -Werte ermittelt. Trägt man nach Lineweaver-Burk (1934) in ein Diagramm die Reziprokwerte für die Glukosekonzentration auf der Abszisse und die Reziprokwerte des aus 1- ^{14}C -Glukose gebildeten $^{14}\text{CO}_2$ auf der Ordinate auf, so erhält man je nach Äscinkonzentration Geraden, die sich auf der Abszisse schneiden. Aus dem Abszissen- bzw. Ordinatenabschnitt wurde die Transportkonstante K_T bzw. die maximale Geschwindigkeit $v_{\max}$ ermittelt.

5. Die Wirkung des Ca^{++} - und Mg^{++} - Gehalts des Inkubationsmediums auf die $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung aus 1- ^{14}C -Glukose

Fettgewebsschleier wurden in der Hälfte der Ansätze in Ca^{++} - und Mg^{++} -freiem Krebs-Henseleit Medium bei 37°C einer 15 min Behandlung mit dem Na-Salz der Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA-Na, 5 mM), einem Komplexbildner für Ca^{++} - und Mg^{++} -Ionen, unterzogen und auf diese Weise nach Angaben von Gould und Chaudry (1970) Ca^{++} - und Mg^{++} -frei erhalten. Anschließend wurde das Gewebe 2 x mit physiologischer Kochsalzlösung und 1 x mit Ca^{++} -, Mg^{++} -freiem Krebs-Henseleit Medium gewaschen. In einer erneuten Inkubation (2 Stunden) wurde untersucht, wie weit im Vergleich zu unbehandeltem Gewebe die Erdalkalitionen (Mg^{++} 1,1 mM; Ca^{++} 2,5 mM) den Einfluß von Äscin und Insulin auf die $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung aus 1- ^{14}C -Glukose verändern.

6. Lipolyse

Zur Stimulierung der Lipolyse wurden Dexamethason ($0,5 \mu\text{g}/3 \text{ ml}$) und Somatotropes Hormon (Wachstumshormon $30 \mu\text{g}/3 \text{ ml}$) Ansätzen mit Fettgewebe (500 mg) zugesetzt und ihre Wirkung in einer 4 h-Inkubation in Kombination mit Ascin und Insulin auf die Lipolyse untersucht. Als Maßstab hierfür diente die Konzentration des dabei gebildeten Glycerins.

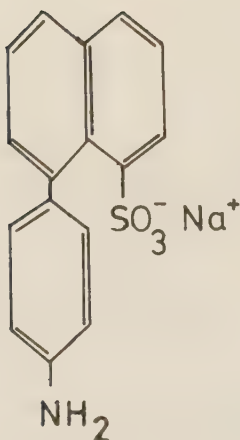
Glycerinbestimmung (Hanahan und Olley, 1958)

Zu $0,5 \text{ ml}$ Medium wurden nach der Inkubation $0,1 \text{ ml}$ $2,5 \text{ N H}_2\text{SO}_4$ und $0,1 \text{ ml}$ $0,1 \text{ M KJO}_4$ -Lösung zugesetzt. Nach 5 min erfolgte die Zugabe von $0,1 \text{ ml}$ $10\% \text{ NaHSO}_3$ und $3,5 \text{ ml}$ Chromotropsäurelösung (1 g Chromotropsäure + $100 \text{ ml H}_2\text{O}$ + $50 \text{ ml } 24 \text{ N H}_2\text{SO}_4$). Dann wurden die Proben 30 min in ein siedendes H_2O -Bad gestellt. Nach Abkühlen der Ansätze wurden je $0,35 \text{ ml}$ halbgesättigter Thioharnstofflösung zupipettiert und die Extinktion bei 578 nm gemessen.

7. Messung der Fluoreszenzintensität des Inkubationsmediums

Wird eine Meßlösung ein Fluorochrom zugesetzt, d. h. eine Substanz, die allein für sich nur geringes Fluoreszenzvermögen aufweist, so kann bei Anlagerung des Fluorochroms an bestimmte Stoffe die Fluoreszenzintensität der Lösung beträchtlich ansteigen. Stryer et al. haben 1965 die Anwendung eines derartigen Fluorochroms, nämlich des Na-Salzes der 1-Anilino-8-naphthalinsulfonsäure (ANS) vorgeschlagen. ANS (siehe Formel) besteht aus einem hydrophoben Ringsystem und einer negativ geladenen Gruppe, der Sulfonsäure. Es löst sich sowohl in Wasser als auch in organischen Lösungsmitteln und bindet sich wegen dieses zweifachen Lösungscharakters an Proteine und Lipide.

ANS



Während der Inkubation bei 37°C war den Ansätzen mit Fettgewebe ANS ($8,5 \times 10^{-6}$ M) zugesetzt. Zu definierten Zeiten wurden einzelne Proben aus dem Wasserbad entfernt und in Eis gestellt.

Die Fettgewebstückchen wurden gesammelt und gewogen, das Medium zentrifugiert und am Aminco Bowman Spektrophotofluorometer (Fa. American Instruments Company, USA) auf sein Fluoreszenzvermögen untersucht. Dazu wurde durch abwechselndes Konstanthalten und Variieren der Anregungs- bzw. Emissionswellenlänge als Maximum der Anregung die Wellenlänge 385 nm gefunden. Bei dieser Anregungswellenlänge wurden die zugehörigen Emissionsspektren der einzelnen Proben gemessen.

8. Auftrennung des Inkubationsmediums mittels Gelchromatographie

Die Auftrennung von Substanzen mittels Säulengelchromatographie hängt einmal von dem Vernetzungsgrad hochpolymerer Harze (Säulenfüllmaterial) und zum anderen von der Molekülgröße in dem zu trennenden Gemisch ab. Gelöstes Material, das größer

als die Maschen des Raunggitters ist, passiert ohne Auftrennung die Säule nach einer Zeit, in der diejenige Menge an Trägerlösung die Säule durchströmt hat, die dem "void volume" entspricht, dem Volumen der Hohlräume zwischen den Harzpartikeln (vom Hersteller angegeben). Das Ende der Fraktionierung ist normalerweise nach zweimaligem Durchfluß des "bed volume", des Säulenvolumens erreicht.

Das Bicarbonatmedium, in dem die Fettgewebsschleier 2,5 h inkubiert waren, wurde gefriergetrocknet, gewogen, in wenig H_2O gelöst und auf eine Chromatographiesäule (Länge 70 cm, Durchmesser 2 cm) aufgetragen, die mit Sephadex G25 fine gefüllt war. Das Dextrangel Sephadex G 25 fine besitzt ein Trennvermögen für Stoffe mit einem Molekulargewicht zwischen 100 (bzw. 1000) und 20 000. Eine peristaltische Pumpe beförderte 60 ml H_2O pro Stunde als Elutionsmittel durch die Säule. Mittels eines Fraktionssammlers (LKB-Produkt Schweden) wurden Proben von jeweils 2,5 ml erhalten. Die einzelnen Fraktionen wurden während bzw. nach der Fraktionierung mittels eines Spektralphotometers auf ihre Extinktion bei 260 nm untersucht. Fraktionen, die einen Absorptionsgipfel bildeten, wurden vereinigt und gefriergetrocknet. Nach Ermittlung des Trockengewichts wurde in den einzelnen Proben der Proteingehalt mittels der Methode von Lowry (1951) und der Zuckergehalt mittels der Anthronmethode gemessen.

Proteinbestimmung nach Lowry

Benötigte Reagenzien:

A: 2 % Na_2CO_3 in 0,1 N NaOH

B: 0,5 % $CuSO_4$ x 5 H_2O in 1 % Tartratlösung

C: Mischung aus 50 ml der Lösung A und 1 ml der Lösung B (1 Tag haltbar)

D: mit H_2O 1:1 verdünnte Folin-Ciocalteus-Lösung

Je 0,5 ml der einzelnen Proben, die 5 - 100 Protein enthalten können, werden mit 2 ml der Lösung C versetzt und 10 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wird 0,2 ml Lösung D zupipettiert und gut durchgemischt. Nach frühestens 30 min wird die Extinktion bei 691 nm oder 750 nm gemessen.

Bestimmung des Gehalts an neutralen Zuckern mittels des Anthronreagenzes (Roe, J.H., 1954)

Reagenz:

Zu 195 ml H_2O werden 500 ml conc. H_2SO_4 zugesetzt. Zur warmen Lösung gibt man 347 mg Anthron und 6,9 g Thioharnstoff und schüttelt, bis sich alles gelöst hat.

Das Reagenz muß zur Messung mindestens 4 Std. alt sein und ist im Kühlschrank ca. 2 Wochen haltbar.

Zu 1 ml-Proben, die 20 - 200 Zucker enthalten können, werden 5 ml kaltes Reagenz zupipettiert. Es wird gut durchgemischt und danach 15 min im Wasserbad bei $100^{\circ}C$ erhitzt. Die Proben werden im H_2O -Bad gekühlt. Nach 20 min. wird die Extinktion bei 600 nm gemessen.

9. Untersuchungen über Ähnliches und unterschiedliches Verhalten von Äscin und Insulin in Bezug auf den Glukosetransport

Äscin und Insulin erhöhen den Glucoseverbrauch im Fettgewebe. Es stellt sich die Frage, wie weit diese beiden Substanzen über denselben Mechanismus wirken. Hierzu wurden folgende Versuche durchgeführt:

- a. Äscin und Insulin wurden gleichzeitig in optimal stimulierenden Konzentrationen eingesetzt, um das mögliche Auftreten eines Synergismus dieser beiden Substanzen zu erkennen.
- b. 3-O-Methylglukose, die mit demselben Transportsystem wie Glukose aufgenommen wird, wurde Fettgewebsansätzen zugesetzt, deren Glukosetransport durch Äscin und Insulin erhöht war.

- c. β -Mercaptoäthanol, eine SH-haltige Substanz, die Insulin bei der Anlagerung am Membranrezeptoren kompetitiv hemmt, wurde als Zusatz bei dem durch Insulin und Äscin stimulierten Glukosetransport verwendet.
- d. Der Einfluß von Gelatine und Albumin auf den durch Äscin und Insulin erhöhten Glukoseverbrauch wurde ermittelt. Diese beiden Stoffe dienen häufig als Mediumszusätze bei Versuchen mit Insulin und Fettgewebe bzw. Fettzellen.
- e. Die Wirkung des Transporthemmstoffs Phenyläthanol auf den Glukoseverbrauch wurde in Kombination mit Insulin und Äscin gemessen.

II. Versuche mit Ascites-Tumorzellen

Yoshida-Ascitestumorzellen (Y.A.T.Z.) wurden 7 oder 8 Tage nach Inokulation in den Bauchraum von Mäusen gesammelt, zentrifugiert (gekühlte Minifuge, Fa. Christ, 3 min, 3000 Rpm) und zur Entfernung des anhaftenden Serumalbumins 5 x mit Ringerphosphatmedium (pH ca. 7,3) gewaschen. Die Serumprotein-freie Zellsuspension wurde auf die jeweiligen Ansätze verteilt. In einem Aliquot wurde unter dem Lichtmikroskop (Zeiss Opton, Deutschland) mittels einer Schilling-Zählkammer die Zellzahl pro ml ermittelt; ein weiteres Aliquot wurde zur Gewichtskonstanz eingetrocknet. Die Zellzahl pro ml bzw ihr Trockengewicht dienten als Bezugsgrößen (10 mg entsprechen 32×10^6 Zellen).

1. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Äscin-behandelten Yoshida-Zellen

Y.A.T.Z., die in Ringerphosphatmedium in einem Schüttelbad bei 37°C 30 min mit und ohne Äscin (Konzentrationsbereich $1-9 \times 10^{-5}\text{M}$) vorbehandelt waren, wurden elektronenoptisch unter besonderer Berücksichtigung der Wirkung von Äscin auf die Membranoberfläche untersucht. Zur Kontrastierung vorwiegend von sauren Glykoproteinen der Membran wurden die Metallkolloide Ruthenium-Rot und Eisen-III-hydroxid verwendet.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen verdanke ich Herrn Prof. Merker.

2. Lebensfähigkeit der Y.A.T.Z.

Zur Feststellung der Lebensfähigkeit unter Äscineinwirkung wurde eine Suspension von Y.A.T.Z. im H_2O -Bad auf 37°C erwärmt. Äscin (Endkonzentration $3 \times 10^{-5}\text{M}$) wurde zugesetzt und zu bestimmten Zeiten ein Aliquot entnommen. Die Zellen wurden sofort gekühlt, zentrifugiert, 1 x mit Ringerphosphatmedium gewaschen und in

frischem Medium aufgenommen. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde mit einer definierten Menge einer Trypanblaulösung (1 % in physiologischer Kochsalzlösung) vermischt. Trypanblau (das Na-Salz der [3,3'-Dimethyldiphenyl]-4,4'-bis-[<azo >-8-amino-naphthol-(1)-disulfonsäure-(3,6)]) ist ein Farbstoff, der sich speziell zur Anfärbung toter Zellen eignet (Schulemann, 1921; Seyderhelm, 1925; Richter und McDowell, 1933). Unter dem Phasenkontrastmikroskop wurde die Zahl der angefärbten und nicht angefärbten Zellen pro ml Suspension ermittelt. Um die Zellschädigung festzustellen, die nur kurzfristiges Einwirken von Äscin verursacht, wurden jeweils 2 ml der Zellsuspension 1,2,3,4,5,6 und 7 min nach Äscinzusatz entnommen, gewaschen und in neuem glukosehaltigem Medium aufgenommen. Der prozentuale Anteil der lebenden Zellen in Abhängigkeit der Inkubationsdauer wurde ermittelt.

3. Aufnahme von Aminosäuren

Der Aminosäuretransport durch die Zellmembran kann je nach Zellart und Aminosäure Unterschiede aufweisen. Für Ehrlich-A.T.Z. entwarfen Christensen und Mitarbeiter (Oxender und Christensen, 1963; Christensen et al., 1967; Christensen, 1968) auf Grund zahlreicher Untersuchungen ein Bild eines Aminosäuretransportsystems, das sich mit Einschränkung auch auf andere Zellarten übertragen läßt. Es gibt 3 verschiedene Systeme für neutrale α -Aminosäuren (A-, L-, ASC-System) und je ein weiteres für β -kationische und β -anionische Aminosäuren.

Das A-System (alanine preferring system) bevorzugt Aminosäuren mit meist kurzen und unpolaren Seitenketten wie Alanin, Glycin, Sarkosin, Serin, Prolin und Methionin und scheint allein für den aktiven Transport verantwortlich zu sein. Für das A-System ist Na^+ und möglicherweise eine Mindestkonzentration von K^+ erforderlich. Das A-System weist den größten Anreicherungseffekt auf und kommt dann auf Grund des großen Konzentrationsgefälles als Energielieferant für das L-System in Betracht.

H^+ -Ionen besitzen eine große Hemmwirkung (Christensen, 1970).

Das L-System (leucine preferring system) zeigt eine Vorliebe für Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten wie Leucin, Isoleucin, Phenylalanin und Methionin. Es ist an den Transportvorgang der erleichterten Diffusion gekoppelt und besitzt gegenüber dem A-System die größere Austauschfähigkeit für die gleiche oder eine ähnliche Aminosäure. Na^+ -, K^+ - und H^+ -Ionen haben keinen Einfluß.

Die Bereiche der beiden Systeme sind z. T. überlappend, d.h. bis zu einem gewissen Grad kann ein Substrat durch beide Systeme transportiert werden. Methionin z.B. wird von beiden Systemen gleich gut befördert.

Im ASC-System (alanine, serine, cysteine preferring system) werden neben Prolin und Cystein vorwiegend aliphatische und hydroxyaliphatische Aminosäuren transportiert, die 3-5 C-Atome enthalten. Wie das A-System ist das ASC-System von der Konzentration der Na^+ -Ionen abhängig. Die Einführung dieses 3. Transportsystems erwies sich als notwendig, da mehrere artifizielle Aminosäuren, deren Aufnahme zunächst nach dem A- oder L-System zu erfolgen schien, selbst im Überschuß nicht die erwartete kompetitive Hemmung gegenüber den Aminosäuren des A- oder L-Systems zeigten.

Aminosäuren, die durch das gleiche Transportsystem befördert werden, beeinflussen sich gegenseitig. Dabei gibt es 4 Möglichkeiten der Wechselbeziehung (Heinz, 1972):

α . cis-Hemmung

Diese Eigenschaft ist sehr häufig und tritt in allen 3 Transportsystemen auf.

β . cis Stimulierung

Beispiele hierfür sind die 1-2 min dauernde Inkorporation von Tryptophan in E.A.T.Z. in Gegenwart verschiedener Aminosäuren wie z.B. Methionin (Jaquez, 1961, 1967) und die in 30 min stattfindende Aufnahme aromatische Amino-

säuren in Sarkom 37-Zellen in Anwesenheit von p-F-Phe-nylalanin (Guroff et al., 1964). Möglicherweise läßt sich dieser Vorgang auf eine trans-Stimulierung zurück-führen.

γ. trans-Stimulierung

Heinz (1954) fand die beschleunigte Glycinaufnahme in E.A.T.Z., die mit Glycin vorbeladen waren. Die trans-Stimulierung erfolgt bei einer Reihe von Aminosäuren, die beim Vorkommen auf derselben Membranseite sich kom-petitiv behindern.

δ. trans-Hemmung

Die trans-Hemmung von Aminosäuren ist ein wenig be-kannter Vorgang. So könnte eine geringfügige Hemmung der Aufnahme von Glycin und α -Ala in E.A.T.Z. durch intrazelluläres Methionin vorliegen (Paine und Heinz, 1960; Christensen, 1970).

Trans-Stimulierung und trans-Hemmung sind auf Grund von Austausch-(exchange) und Gegentransport-(counterflow) Effekt vorwiegend Kennzeichen des L-Transport-Systems.

Obwohl über die chemische Natur des Mechanismus der 3 Transportsysteme (A,L,ASC) bisher wenig bekannt ist, wird heute allgemein die Existenz eines beweglichen Trägers vorausgesetzt.

Ungeklärt ist vor allem auch die Frage nach der benötigten Energie für den aktiven Transport, wie er im A-System vorliegt. Nach der Ionengradientenhypothese (Riggs, Walker, Christensen, 1958) soll ein großer Anteil der erforderlichen Energie durch den zelleinwärtsgerichteten Na^+ -Gradienten (Kromphardt, 1963; Christensen et al., 1967; Crane, 1965) und ein weiterer Teil durch den nach außen gerichteten K^+ -Gradienten (Eddy, 1968a, 1969; Hogg, 1969; Heinz und Walsh, 1958) geliefert werden.

Ein Schema für die Kopplung des Aminosäuregradienten mit dem elektrochemischen Potentialgradienten von Na^+ und K^+ entwarf Crane (1965). Danach soll der Influx von

Na^+ und Aminosäuren mit einem Träger über einen ternären Komplex verlaufen. In diesen Prozeß soll auch der Efflux von K^+ mitbeteiligt sein. Trotz der Vielzahl der Befunde, die diese Ionengradientenhypothese stützen (Eddy, 1967, 1968; Jaquez und Schafer, 1969; Potashner und Johnstone, 1970, 1971; Schafer und Heinz, 1971), kann aber auch der Cotransport von Na^+ , K^+ und Aminosäuren die benötigte Energie zur Anreicherung der Aminosäuren nicht ausreichend decken (Eddy, 1968b; Schafer und Jaquez, 1968). Deswegen muß zusätzlich ein nicht bekannter Energieanteil aus dem Stoffwechsel bezogen werden, der durch die Spaltung von energiereichem ATP freigesetzt wird (Potashner und Johnstone, 1971; Johnstone, 1972).

Eine umfassende Übersicht über den gegenwärtigen Stand stammt von Schultz und Curran (1970).

a. Aufnahme und Austauschdiffusion von Glycin
und α -Aminoisobuttersäure

Je 3 ml Zellsuspension wurde auf 20-36 Zentrifugengläser verteilt. In die Hälfte der Ansätze wurde 100 μl nichtmarkierte Glycinlösung zugesetzt (Endkonzentration 10-15 mM). Nach Waschen und Mediumwechsel schloß sich eine 20 min Inkubation in einem Wasserschüttelbad bei 37°C an. Durch Hineinstellen der Zentrifugengläser in eine Eis-Kochsalzkältemischung wurde der Vorgang der Aminosäureaufnahme gestoppt. Nach Zentrifugation (Kühlzentrifuge Phywe 5000 Rpm, 5 min) und Mediumwechsel wurden die Gläser zur Temperierung auf 37°C 5 min in das Schüttelbad gebracht. Dann wurden 100 μl radioaktiv markierte Aminosäurelösung (Endkonzentration ca. 1 μCi) und 100 μl gelöstes Inulin (Endkonzentration 6 mg/ml) in alle Ansätze und 100 μl Äscinlösung (Endkonzentration $3 \times 10^{-5}\text{M}$) in die Hälfte der Proben zupipetiert. Dadurch wurde die Aufnahme bzw. der Austausch der betreffenden Aminosäure in Gang gesetzt. Zum

Zeitpunkt 0,1,2,3,4 und 5 min wurden je 4 Ansätze aus dem H₂O-Bad genommen und in ein Kältegemisch gestellt. Nach Abzentrifugieren der Zellen (Phywe 12000 Rpm, 5 min) wurde die überstehende Lösung sofort abgetrennt. Je 100 µl der Überstände wurde zur Bestimmung der Radioaktivität und der Inulinkonzentration entnommen. Der Zellrückstand wurde in 0,5 ml Medium suspendiert. Davon wurden 100 µl zur Inulinmessung angesetzt, während der verbleibende Rest mit 0,4 ml 20 % NaOH versehen und in verschlossenen Zentrifugengläsern über Nacht bei 50°C gelöst wurde. In 200 µl Proben wurde der Gehalt an Radioaktivität ermittelt. Die Berechnung des TC-Raumes erfolgte wie bereits beschrieben.

b. Aufnahme von Leucin

Die Versuchsanordnung wurde gegenüber der Aufnahme von Glycin und α-AiB in der Weise verändert, daß die Zellen nach der Vorinkubation, in der sie mit nichtmarkierter Aminosäure beladen worden waren, nicht mehr gekühlt wurden, sondern mit 37°C warmen Medium 1 x gewaschen und dann wieder in 37°C warmen Medium aufgenommen wurden. Unmittelbar daran schloß sich die Hauptinkubation an, da in diesem Fall keine Zeit zur Temperatureinstellung abgewartet werden mußte.

4. Glukoseverbrauch durch Y.A.T.Z.

Der Glukosetransport in Y.A.T.Z. soll wie beim Fettgewebe vorwiegend durch erleichterte Diffusion erfolgen (Nirenberg und Hogg, 1956, 1958; Crane et al., 1957; Kolber und Lefevre, 1967). Für diesen Vorgang könnte wie beim Fettgewebe ein Carriersystem verantwortlich sein (Cirillo und Young, 1964).

Die Größe des Glukoseverbrauchs läßt sich aus der Glukoseabnahme im Medium, dem intrazellulär beim anaeroben

Abbau entstandenen Laktat und dem radioaktiv markierter Glukose gebildeten $^{14}\text{CO}_2$ ermitteln. Die Größe der $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung ist im entscheidenden Maß von der Art der zugesetzten radioaktiven Glukose abhängig. 1- ^{14}C -Glukose z.B. liefert anders als beim Fettgewebe beim Abbau durch Tumorzellen nur in geringem Umfang $^{14}\text{CO}_2$, da nach Gumaa und McLean (1969) und nach Brand und Deckner (1970) bei A.T.Z. nur 1 % der Glukose den Pentosephosphatweg durchläuft.

a. Glukoseabnahme im Medium

10 - 15 ml Proben einer im H_2O -Schüttelbad auf 37°C temperierten Zellsuspension (ca. 75×10^6 Zellen/ml) erhielten den Zusatz von 40-80 μmol Glukose/ml und von 100 μl Äscinlösung (Endkonzentration 3×10^{-5} M). Nach 0,1,2,3,4,6,8,10,15,20,30 und 40 min wurden den Ansätzen 2 Proben zu je 100 μl entnommen und auf vorbereitete 500 μl 10 % HClO_4 pipettiert. Zur Glukosebestimmung wurden je 100 μl davon verwendet.

In etwas abgeänderter Form wurden den Ansätzen jeweils 500 μl Zellsuspension entnommen, die Zellen mit einer Eppendorf-Tischzentrifuge sofort abzentrifugiert (30 sec) und unmittelbar darauf der Überstand von den Zellen getrennt. In einem Aliquot wurde die verbliebene Glukosemenge ermittelt (Boehringer-Testatz).

b. CO_2 -Messung

Die Bildung von $^{14}\text{CO}_2$ aus 1- ^{14}C -Glukose wurde in analoger Weise wie beim Fettgewebe untersucht. Pro Ansatz wurden 3 bzw. 4 ml einer Suspension von Y.A.T.Z. eingesetzt.

5. Messung der Atmung

Die Messung der Atmung von Y.A.T.Z. erfolgte mit Hilfe eines Warburg-Apparates (Modell F, Fa. Braun, Melsungen). Durch Zugabe von 0,2 ml 20 % KOH in den zentralen Innen-

raum und von 0,4 ml Äscinlösung (Endkonzentration $3 \times 10^{-5} \text{M}$) bzw Medium in den Seitenarm der Warburggefäße wurde die Messung vorbereitet. Im peripheren Hauptraum befanden sich 2 ml Zellsuspension mit Glukosezusatz ($10 \mu\text{M}/\text{Ansatz}$). Durch Einbringen der Gefäße in das Wasserbad des Geräts wurden die Zellen in 10 min auf 37°C temperiert, wobei sie gleichzeitig mit O_2 durchströmt wurden. Nach der Gleichgewichtseinstellung wurde der Sauerstoffverbrauch durch Druckänderung am Manometer über einen Zeitraum von 40 min alle 2,5 min abgelesen. Dann wurde der Inhalt der Seitenarme in die Zellsuspension entleert. Damit setzte die Äscinwirkung auf die Atmung ein, was sich aus den unterschiedlichen Druckänderungen gegenüber Kontrollwerten an den einzelnen Manometerkapillaren ablesen ließ. Die Messung erstreckte sich über weitere 40 min.

6. Einfluß von Äscin auf den Na^+ -, K^+ - und Ca^{++} -Fluß durch die Membran

Die immense Bedeutung der Na^+ -, K^+ -, Mg^{++} - und Ca^{++} -Ionen ist daraus ersichtlich, daß sie an so elementaren Prozessen beteiligt sind, wie Na^+ am aktiven Transport von Aminosäuren und Zuckern und bei der Insulinwirkung, K^+ an der Bildung von Makromolekülen, der DNS-Synthese (Lubin, 1967; Kuchler, 1967; Prives und Quastel, 1969; Jones und Banks, 1969) und an der Zellteilung (Lamb, 1970; Robbins et al., 1970), Mg^{++} als Aktivator für Enzymaktivitäten und Ca^{++} als wirksamer Faktor bei der Atmung (Chance, 1965; Lehninger, 1969), bei Muskelkontraktionen (Bianchi und Shanes, 1965; Ebashi und Endo, 1968), bei der Hormonsekretion endokriner Drüsen (Rubin, 1974), bei der Aggregation und Kommunikation von Zellen untereinander (Gingell et al., 1970) und bei der Permeabilitätsbeschaffenheit der Zellmembran (Dawson und Hauser, 1970; Maizels, 1959; Manery, 1966; Whitembury et al., 1960).

Zahlreiche Untersuchungen wurden über den Transport dieser Alkali- und Erdalkalitionen durch die Zellmembran durchgeführt, die intensivsten über den aktiven Na^+ - und K^+ -Transport, die sog. Na^+ -, K^+ -Pumpe (Skou, 1957; Caldwell et al., 1960). Einzelne Modellvorstellungen hierüber (Skou, 1965; Post et al., 1965; Opit und Charnock, 1965; Jardetzky, 1966; Lowe, 1968; Stone, 1968; Caldwell, 1968) hat Caldwell (1970) in einem Übersichtsartikel gegenübergestellt. Als Bilanz werden pro zerfallendem ATP 3Na^+ -Ionen nach außen gepumpt und 2K^+ -Ionen in die Zelle aufgenommen. Für die Elektroneutralität sorgen H^+ - und Cl^- -Ionen. Der Energiebedarf für die Aufrechterhaltung der asymmetrischen Ionenverteilung wird auf 5-10 % des Ruheumsatzes geschätzt.

Der Transport von Ca^{++} durch die Zellmembran wird als passiver Einstrom, der möglicherweise an ein Carriersystem gekoppelt ist, und als aktiver Efflux gegen einen großen elektrochemischen Gradienten angesehen, der Energie aus dem Stoffwechsel erfordert (Borle, 1969a, 1969b). Zumindest teilweise soll der Ca^{++} -Transfer stöchiometrisch im Austausch mit Na^+ (3Na^+ für 1Ca^{++}) erfolgen (Blaustein und Hodgkin, 1963; Russell und Blaustein, 1974). Für die sehr geringe, intrazelluläre, freie Ca^{++} -Aktivität (im Bereich von 10^{-6}M) sollen die Mitochondrien als eine Art Puffersystem verantwortlich sein (Borle, 1973).

Befunden von Siering (1962a, 1962b, 1962c, 1962d) und Würker (1969) zufolge wird durch Äscin der K^+ -, Na^+ - und Ca^{++} -Fluß durch die Zellmembran verändert. Während Äscin in vivo bei den verschiedenen Organen der Ratte vor allem die Na^+ -Ausscheidung fördert, verursacht dieses Saponin bei E.A.T.Z. in vitro in ihrer ursprünglichen Asciteslösung eine Erhöhung des K^+ -Gehalts und eine Abnahme der Na^+ - und vor allem Ca^{++} -Konzentration im Medium.

In Anlehnung daran wurden in dieser Arbeit Versuche mit

dem Ziel durchgeführt, die Äscinwirkung auf den Ionentransfer durch die Plasmamembran von gewissen Y.A.T.Z. in verschiedenen Medien zu ermitteln. Als veränderliche Größen wurden die Zusammensetzung des Inkubationsmediums, die Art der Vorbehandlung der Y.A.T.Z., der Zusatz von Substanzen und die unterschiedliche Ca^{++} -Konzentration des Mediums gewählt.

Als Inkubationsmedien dienten normales und K^{+} -freies Ringerphosphatmedium, physiologische Kochsalzlösung und als ionenarme Medien isotone Saccharose- bzw. Mannitlösung, wobei die letztere z. T. Ionenzusätze von je 10 mM Na^{+} , K^{+} und Ca^{++} enthielt.

Die Vorbehandlung der Zellen bestand in der Abspaltung von geladenen Gruppen an der Membran. Neuraminidase (0,5 mg/ml; 30 min, 37°C , pH 7,3) wurde in der Absicht zugesetzt, die negativ geladene Sialinsäure abzuspalten und Phospholipase D (8 mg/ml; 30 min, 27°C , pH 5,9) führte zur Ablösung des positiv geladenen Cholins. Nach der Enzymeinwirkung wurde das Inkubationsmedium entfernt, die Zellen 1 x gewaschen und erneut in frischem Medium aufgenommen.

Die Zusätze zum Inkubationsmedium bestanden aus trypsinisiertem Con A und aus Valinomycin.

Con A, das sich spezifisch an die Oberfläche von transformierten Zellen bindet, besitzt nach Burger (1970) zwei Bindungsgruppen, die für die Agglutination verantwortlich sind. Durch die Spaltung mit Trypsin lassen sich aus Con A Bruchstücke mit einer einzigen Bindungsstelle gewinnen, die keine Agglutination mehr auslösen können. Zu diesem Zweck wurden 1 ml Con A - Lösung (=25 mg) mit 1 ml 0,2 M Phosphatpuffer ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 7,0) gemischt und mit 4 mg Trypsin (in 500 μl H_2O) 5 Std. bei 37°C versetzt. Die Beendigung der Trypsineinwirkung erfolgte durch Zusatz von 4 mg Trypsininhibitor (in 500 μl H_2O). 100 μl dieser trypsinisierten Con A-Lösung wurden zu 15 ml Zellsuspension zupipettiert. Gleichzeitig oder erst nach Ablauf von

20 min wurde Äscin zugesetzt.

Valinomycin wurde in einer Konzentration von 0,5 mg pro 15 ml Ansatz zugesetzt. Diese Substanz wirkt als Ionophor durch die Zellmembran und führt auf diese Weise zu einer Erhöhung der Kationenpermeabilität speziell für K^+ (Bhattacharya et al., 1971; Moore und Pressman, 1964; Stark und Benz, 1971; Poole et al., 1972). Schließlich wurde zur Ermittlung des Äscineinflusses auf den Kationentransfer der Zusatz an extrazellulärem Ca^{++} selbst variiert. Sehr geringe Ca^{++} -Konzentrationen wurden durch eine 15 min Vorinkubation mit EDTA (5 mM) erzielt. Parallel mit der veränderten Ca^{++} -Konzentration wurden der Glukose- und Glycin- bzw. α -AIB-transfer durch die Abnahme im Medium bzw. durch die Aufnahme in die Zellen gemessen.

Die 5 x gewaschenen Zellen wurden in glukosehaltigem Mannitmedium suspendiert. Der neutrale Zuckeralkohol führte einmal zur Herabsetzung der Ionenstärke bei den Leitfähigkeitsmessungen und störte außerdem im Gegensatz zur Saccharose und zu Sorbit nicht die Glukose-oxidase-reaktion.

Nach definierten Zeiten wurden aus den verschiedenen Ansätzen jeweils 1 ml Zellsuspension entnommen, die Zellen abzentrifugiert und der Überstand sofort abgetrennt. Im Überstand wurde die Na^+ - und K^+ -Konzentration mit dem Flammenphotometer (Modell 143 und 343, Instrumentation Laboratory Inc., Boston, USA), die Ca^{++} -Konzentration mit dem Atomabsorptionsspektrophotometer (Varian Techtron Modell 1200, Darmstadt) und der Glukosegehalt mit dem GOD-Testsatz bestimmt.

7. Leitfähigkeitsmessungen

Der Befund, daß Äscin passive und aktive Ionenflüsse durch die Membran, wie z. B. den Ca^{++} -Influx und den K^+ -Efflux und unter bestimmten Bedingungen auch den

Na^+ -Efflux beeinflusst und damit die Ionenstärke im Medium verändert, läßt die Methode der Leitfähigkeitsmessung geeignet erscheinen, um die aktuelle Ionenstärke im Medium schnell und während des gesamten Zeitverlaufs sichtbar zu machen. Die Anlage zur Leitfähigkeitsmessung wurde aus einer Meßbrücke, einer Leitfähigkeitszelle, einer Spannungsquelle und einem Kompensationsschreiber zusammengestellt (Abb.3). 15 ml Y.A.T.Z. (2 x mit Ringerphosphatmedium und 3 x mit isotoner Saccharoselösung, pH 7,3 - 7,4) in 10,5 % Saccharose suspendiert, wurden unter Rühren in einem Thermostaten auf 37°C erwärmt, bis sich ein gleichmäßiger Verlauf der Leitfähigkeit beobachten ließ (ca. 7 min). Dann erfolgte der Zusatz von Ascin unterschiedlicher Konzentration.

8. Anlagerung von Ascin an die Zellmembran

Die Membran wahrscheinlich aller Zellen trägt an der Außenseite eine negative Überschußladung. Ein großer Anteil der negativen Ladung stammt von der Sialinsäure (Wallach und Lylar, 1961; Ruthenstroth-Bauer et al., 1961a, 1961b; Cook, Heard und Seaman, 1962; Curtis, 1967). Aber auch geladene Seitenketten von Membranproteinen wie die NH_3^+ -Gruppe (Wallach et al., 1966; Cook und Jacobsen, 1968; Merishi, 1970), Membran-RNS (Weiss und Mayhew, 1966, 1969), polare Membranlipide mit ihren $-\text{PO}_4^-$ und N(R)_3^+ -Gruppen (Mayhew und Weiss, 1968) und eine Reihe schwach saurer, nicht näher identifizierter Gruppen tragen zur Gesamtladung der Oberfläche bei (Merishi, 1972). Die Anzahl derartiger Gruppen und die Art der Zusammensetzung ist je nach Zellart verschieden. Bei den hier verwendeten Y.A.T.Z. soll nach Sherbet et al. (1972) die Ladung hauptsächlich auf die $-\text{COO}^-$ -Gruppe der Sialinsäure und auf die $-\text{PO}_4^-$, $-\text{SH}$ und $-\text{NH}_2$ -Gruppen zurückzuführen sein. Die Autoren berechneten unter der Voraussetzung, daß sich die Oberflächenladung hauptsächlich aus diesen

Meßanordnung zur Leitfähigkeitsmessung

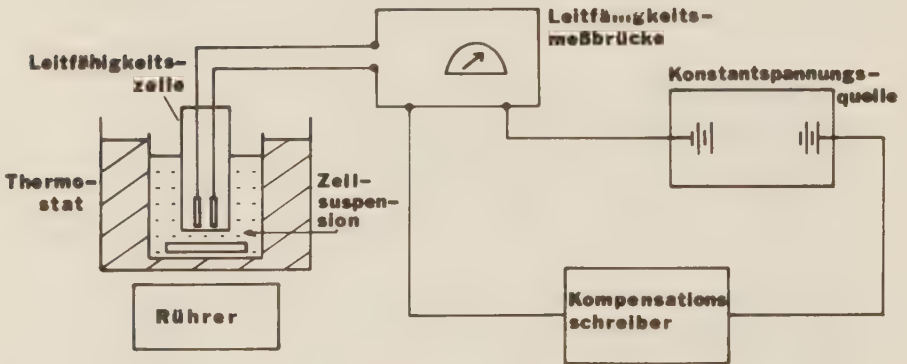


Abb. 3

ionisierbaren Gruppen zusammensetzt, für Y.A.T.Z. einen isoelektrischen Punkt zwischen 5,6 und 6,4 und fanden mit 6,4 den pI-Wert experimentell bestätigt.

Über die Anzahl der Ladungen geben Arbeiten von Cook, Heard und Seaman (1962), Mayhew und Weiss (1968), und Merishi (1970) Aufschluß. Bei E.A.T.Z. sollen die geladenen Gruppen in der Größenordnung von $1 - 4 \times 10^7$ pro Zelle liegen. Nach Merishi könnten unter der Voraussetzung gleichförmiger Ladungsverteilung die einzelnen ionisierbaren Gruppen in tetragonaler oder hexagonaler Anordnung vorliegen (Merishi, 1972). Ruhenstroth-Bauer et al. (1961a, 1962), Fuhrmann et al. (1962) und Weiss et al. (1967, 1971, 1972a, 1972b) haben demgegenüber einer Hypothese den Vorrang gegeben, die von einer Oberfläche mit unterschiedlicher Ladungsdichte ausgeht. Vor allem sollten Enzym-empfindliche Stellen wie die $-\text{COO}^-$ -Gruppe der Sialinsäure oder die $-\text{PO}_4^-$ -Gruppe von Phospholipiden an einzelnen Stellen in durchschnittlich höherer Ladungsdichte vorliegen.

Über die Bedeutung und Funktion der einzelnen ionisierbaren Gruppen sind manche Spekulationen angestellt worden. So soll die Integrität und Funktion der Zellmembran von der Zahl und der Verteilung der SH-Gruppen abhängig sein. An dieser Stelle soll der Angriffspunkt ionisieren der Strahlen sein, die biologische Veränderungen wie eine erhöhte K^+ -Permeabilität hervorrufen.

Von der negativen Ladung der Sialinsäure soll die Größe der elektrophoretischen Beweglichkeit (EPM), der Adhäsion, der Kontakthemmung und der Invasionsfähigkeit abhängen (Abercrombie, 1962; Forrester, 1962; Forrester und Stoker, 1964; Forrester und Salomon, 1967; Cook und Jacobsen, 1968). Untersuchungen von Maekawa et al. (1971) zufolge bleibt der Gehalt an Neuraminsäure während des Zellebens nicht konstant, sondern verringert sich in bestimmten Teilungsphasen.

Eine weitere integrale, strukturelle Komponente der Membranoberfläche vor allem von schnell wachsenden, sich

teilenden Zellen ist die RNS (Weiss und Mayhew, 1969; Woo und Cater, 1972). Sie könnte als eine Art "Erkennungscoat" eine immunologische Funktion ausüben (Fishman, 1961; Alexander, 1967; Kennedy et al., 1969; Pilch und Ramming, 1970; Bell und Dray, 1970; Kolodny, 1971).

Die Einflußnahme eines Stoffes beginnt normalerweise mit der Adsorption bzw. Bindung an bestimmte Membranbezirke. Dieser erste Schritt soll bei dem Saponin Äscin untersucht werden.

Äscin ist eine Säure, die mit ihrem zentralen, hydrophoben Ringsystem sowie den hydrophilen Zucker- und Säureanteilen und der negativen Ladung eine Reihe von Bindungsmöglichkeiten hat. Um Hinweise für den zeitlichen Ablauf der Äscinwirkung zu erhalten, wurde eine mit Tritium markierte Substanz verwendet (markiertes Äscin : nicht markiertes Äscin = 1 : 9).

Wie üblich vorbereitete Y.A.T.Z. wurden im Wasserbad auf 37°C temperiert. Es erfolgte der Zusatz von ^3H -Äscin. Nach Entnahme von je 1 ml Zellsuspension zu verschiedenen Zeiten wurde die Menge des angelagerten Äscins an Hand der Radioaktivität an/in den Zellen festgestellt. Dazu wurde die entnommene Zellsuspension sofort im Eisbad gekühlt, zentrifugiert, mit eisgekühltem Medium 2 x gewaschen und schließlich durch Zusatz von 1 ml 10 % NaOH in verschlossenen Zentrifugengläsern bei 50°C über Nacht gelöst. 200 µl der gelösten Zellen in Szintillatortoluol-Äthanol-Gemisch gelangten zur Radioaktivitätsmessung.

In weiteren Versuchen wurden Y.A.T.Z. 1, 7, 10, 15 min mit Äscin vorinkubiert, anschließend zentrifugiert und 1 - 3 x gewaschen. In einer weiteren Inkubation mit frischem Medium wurde die Abgabe von ^3H -Äscin an das Medium bestimmt.

9. Titration von Yoshida-Zellen

Die Aussagekraft der Titration von Y.A.T.Z. ist begrenzt. Zum einen findet man auf der Membranoberfläche eine große

Anzahl positiver und negativer Ladungen, so daß das Titrieren von Zellen nur eine Aussage über die Gesamtladung zuläßt. Zum anderen werden die Zellen bzw. die Membranen bei einem stark sauren oder alkalischen unphysiologischen pH-Wert beträchtlich geschädigt, daß eine erfolgte Änderung auf den pH-Einfluß zurückgeführt werden könnte. Trotz dieser Einschränkungen kann es von Interesse sein, das Verhalten Äscin-behandelter Zellen gegenüber Kontrollzellen beim Übergang in saure bzw. alkalische Bereiche zu verfolgen.

Y.A.T.Z. wurden wie üblich 3 ~~x~~ mit Ringerphosphatmedium, dann jedoch 2 x mit physiologischer NaCl-Lösung (bzw. isotoner Saccharoselösung) gewaschen und darin wieder suspendiert. Die Zellen wurden auf 37°C erwärmt und die eine Hälfte mit Äscin versetzt (Endkonzentration $3 \times 10^{-5} \text{M}$). Nach 3, 7 und 15 min Äscineinwirkung wurde ein Teil der Zellen aus dem H₂O-Bad entfernt, zentrifugiert, gewaschen und in frischer Kochsalzlösung suspendiert. Anschließend wurden 6 ml Zellsuspension in einem kleinen Becherglas mit einem automatischen Titriergerät (Dosigraph E 364, Impulsomat E 373, pH-Meter E 300; Fa. Metrohm Ltd., Herisau, Schweiz) mit Säure (0,1 N H₂SO₄) bzw. Base (0,1 N NaOH) bis zum Endpunkt titriert, wobei jeder Ast der Kurve getrennt für sich beginnend vom neutralen pH-Bereich aufgezeichnet wurde.

10. Isoelektrische Fokussierung von Yoshida-Zellen

Als nach außen wirksame Ladung einer Zelle kommen alle ionisierbaren Gruppen in Betracht, die innerhalb einer Oberflächenschicht von 10 μ Tiefe liegen. Ein gutes Maß für die Nettoladung einer Zelle ist die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld, die sog. elektro-phoretische Beweglichkeit, die durch spaltende Enzyme wie Neuraminidase, RNS-ase, Trypsin und andere verringert wird. Den Zahlenwert der EPM von Y.A.T.Z. haben Maekawa et al. (1971) mit $(-1,305 \pm 0,080) \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{v}^{-1} \text{sec}^{-1}$ angegeben. V.Behmer et al. (1970) hatten einen Wert in ähnlicher Größe gefunden.

Eine Methode, die ebenfalls die Nettoladung der Zelloberfläche erfaßt, ist die isoelektrische Fokussierung. Die Zellen wandern in einem pH-Gradienten zu ihrem isoelektrischen Punkt, d. h. zu der Stelle, wo ihre Ladung entsprechend der Dissoziierbarkeit der ionisierbaren Gruppen gleich Null wird. 1966 wurde die isoelektrische Fokussierung von Vesterberg und Svenson als effektvolle Trennungsmethode mit hohem analytischem Auflösungsvermögen für Ampholyte, vornehmlich Proteine eingeführt. Eine ausführliche Beschreibung über begrenzende Faktoren und theoretische Einzelheiten lieferte Haglund (1967). Sherbet und Lakshmi (1969) wendeten die Methode der isoelektrischen Fokussierung zur Bestimmung der negativen Nettooberflächenladung der gesamten Zellen an. Sie fanden, daß Y.A.T.Z. in zwei Peaks aufgetrennt werden. Der größere ($pI\ 6,35 \pm 0,19$) soll hauptsächlich lebende Zellen (ca. 80%) enthalten, während der kleinere ($pI\ 4,79 \pm 0,3$) vor allem aus toten Zellen bestehen soll.

Ca. $50 - 100 \times 10^6$ Yoshida-Ascitestumorzellen (3 x mit Ringerphosphat- und 2 x mit 10,5% Saccharoselösung gewaschen) wurden in 55 ml isotoner Saccharoselösung suspendiert, der 0,65 ml Ampholinlösung (pH-Bereich 3 - 10) zugesetzt war (Ampholine sind eine synthetische Mischung aus niedermolekularen aliphatischen Polyaminopolycarbonsäuren, die im elektrischen Feld einen linearen pH-Gradienten eines vorgegebenen pH-Bereichs aufbauen). Die Zellsuspension wurde in den Vorratszylinder eines Gradientenmischers gebracht, während der Mischzylinder mit 55 ml einer 40% Saccharoselösung unter Zusatz von 1,9 ml Ampholin aufgefüllt wurde. Mit einer peristaltischen Pumpe wurde in der wassergekühlten Säule ein linearer Dichtegradient aufgebaut und durch Anlegen einer Gleichspannung von ca. 400 V wurde dem Dichtegradienten ein linearer pH-Gradient überlagert. Darin wanderten die geladenen Zellen zu ihrem isoelektrischen Punkt. Das Ende der Trennung ließ sich durch einen starken Abfall der

Stromstärke erkennen. Anschließend wurde der Säulinhalt mit einem Fraktionssammler in ca. 65 Proben (je 2,5 ml) zerlegt, deren pH-Wert gemessen (Präzisions-pH-Meter Typ pH 34; Fa. Knick, Berlin) und deren Extinktion bei 260 bzw. 280 nm bestimmt wurde (Spektrophotometer PMQ II/M4Q III, Fa. Zeiss, Wetzlar).

Die Proben, in denen die Extinktion, d. h. die Zellzahl einen Gipfel darstellte, wurden vereinigt, zentrifugiert und die Zahl der lebenden Zellen mittels der Anfärbemethode mit Trypanblau unter dem Mikroskop festgestellt.

11. Fluorometrische Bestimmung von abgelöstem Zellmaterial

Die Fluoreszenzmessungen dienten der Feststellung, ob und in welchem Umfang Äscin Oberflächenmaterial von den Zellen ablöst. Derartige Effekte sind bei einer Reihe von Stoffen aus Untersuchungen bekannt, die zweierlei Probleme behandelten:

- a. Aus Membranen von lebenden Zellen bzw. aus bereits isolierten Plasmamembranen sollten Bestandteile in ihrer ursprünglichen Form isoliert und charakterisiert werden. Die Verwirklichung dieser Vorstellung ist mit großen Schwierigkeiten verbunden, da die verschiedenen Präparationsmethoden häufig selbst Veränderungen der Membran bzw. der Bestandteile verursachen.
- b. Die zweite Aufgabe bestand darin, die durch Ablösen kleinerer definierter Spaltprodukte hervorgerufene Membranänderung in Verbindung zu gewandelten Membraneigenschaften zu setzen.

Zum Loslösen von Membranbestandteilen wurden u. a. folgende Mittel verwendet:

- a. hypotone bzw. hypertone Salzlösungen von $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ (Weimer, 1950; Marcante, 1963; Caputo und Marcante, 1964), Harnstoff-EDTA (Merz et al., 1972), Tris-EDTA (Garrard, 1971).

- b. organische Lösungsmittel wie Dimethylformamid-HCl (Schnaitman, 1969), Butanol-H₂O (Poulik und Lauf, 1969), Phenol-H₂O (Metz et al., 1971), Glycerin, Dimethylsulfoxid, Inosit (Eng und Morgan, 1969),
- c. Detergentien wie Na⁺-Desoxycholat (Bomstein et al., 1961; Seji und Iwashita, 1964), SDS (Rosenberg und Guidotti, 1968, 1969), Triton X 100 (Bosmann et al., 1968; Caccam und Eylar, 1970),
- d. Enzyme wie Trypsin (Winzler et al., 1967; Buck, Glick und Warren, 1970), Pronase (Buck et al., 1971; Phillips und Morrison, 1971), Papain (Nathenson et al., 1970),
- e. Ultraschall (Rosenberg und McIntosh, 1968; Samson und Holland, 1970).

In einem Übersichtsartikel hat Guidotti (1972) die Daten der einzelnen Trennmethode bei den unterschiedlichsten Zellarten den erhaltenen Bruchstücken gegenübergestellt. Die abgelösten Membranbestandteile wurden als Proteine (z. B. Enzyme), als Glykoproteine und als Lipoproteine identifiziert.

a. Fluoreszenzmessung mit ANS (siehe S. 47)

Eine Reihe von Erlenmeyerkölbchen mit Suspensionen von Y.A.T.Z., die wie üblich 5 x gewaschen waren, wurde im H₂O-Bad auf 37°C erwärmt. Mit der Zugabe von ANS (8,5 x 10⁻⁶M) und von Äscin (3 x 10⁻⁵M) begann die Reaktion.

Nach bestimmten Zeiten wurde jeweils ein Kolbenpaar (mit und ohne Äscin) aus dem H₂O-Bad entfernt, gekühlt und die Zellen abzentrifugiert. Im Überstand wurden die Emissionsspektren gemessen und die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Inkubationsdauer bestimmt. Das Maximum der Anregung lag bei 385 nm, das Maximum der Emission bei 490 nm.

b. Messung der natürlichen Eigenfluoreszenz von Membranmaterial

Nach Resch et al. (1971) ist es möglich, ohne Zusätze quantitative Fluoreszenzmessungen von Membranproteinen durchzuführen, die allein auf deren natürlicher Eigenfluoreszenz beruhen. Danach erhält man bei eingestrahltm Licht der Wellenlänge 286 nm, im Emissionsspektrum einen Gipfel, dessen Maximum bei 340 nm liegt und dessen Größe von dem Tryptophan- und Tyrosingehalt des Proteins abhängig ist. Voraussetzung für diese Fluoreszenzbestimmung ist, daß in dem Bereich von 280 - 340 nm das Absorptionsvermögen der untersuchten Lösung gering ist.

Die Proben wurden analog der ANS-Fluoreszenzmessung vorbereitet.

12. Gravimetrische Ermittlung des abgelösten Zellmaterials

Zur Bestimmung der Menge des abgelösten Materials wurde ein der Fluoreszenzmessung analoger Versuch durchgeführt. Nach Abzentrifugieren der Zellen wurde der verbleibende Überstand in vorgewogene Gefäße gegossen, gefriergetrocknet und auf der Analysenwaage bis zur Gewichtskonstanz ausgewogen.

In einigen Versuchen wurde in den Zentrifugaten durch 3 - 5 min Erhitzen auf 60 - 70°C oder durch Zugabe von HClO₄ Material gefällt. Der Niederschlag und der verbleibende Überstand wurden getrennt voneinander gefriergetrocknet und ausgewogen. Die ermittelten Gewichte wurden in ein Diagramm in Abhängigkeit von der Einwirkungsdauer des Äscins übertragen. Durch die Messung der Radioaktivität wurde der Verbleib des markierten ³H-Äscins festgestellt.

13. Isoelektrische Fokussierung von Zellüberständen

Zentrifugate von Yoshida-Zellsuspensionen, auf die Äscin

7, 15 oder 30 min eingewirkt hatte, wurden im Gradientenmischer der Saccharoselösung mit der geringeren Dichte zugesetzt. Die Füllung der Säule, die Fokussierung und die Fraktionierung erfolgten wie bei den entsprechenden Versuchen mit Zellen.

Fraktionen, die bei der Extinktionsmessung bei 260/280 nm einen Peak bildeten, wurden vereinigt, gefriergetrocknet und gewogen. In den erhaltenen Proben wurde die Radioaktivität im Tricarb, der Proteingehalt nach Lowry, der Zuckergehalt mittels der Anthronmethode und der Sialinsäuregehalt nach der Thiobarbitursäuremethode (Warren, 1959) bestimmt.

Die fraktionierten, vereinigten Proben wurden in einigen Fällen auch dialysiert, anschließend gefriergetrocknet und wie oben weiteruntersucht.

Sialinsäurebestimmung

Benötigte Reagenzien:

Reagenz 1: 0,2 M NaJO_4 in 9 M H_3PO_4

Reagenz 2: 10 % NaAsO_2 und 0,5 M Na_2SO_4 in 0,1 N H_2SO_4

Reagenz 3: 0,6 % Thiobarbitursäure in 0,5 M Na_2SO_4 -Lösung

Ausführung:

Je 200 μl der Meßproben, die bis zu 0,05 μmol NANA enthalten können, werden mit 100 μl der Lösung 1 versetzt, geschüttelt und 20 min bei Zimmertemperatur stehengelassen.

Die Proben erhalten 1 ml der Lösung 2. Sie werden geschüttelt, bis die gelbbraune Farbe verschwindet.

Nach Zusatz von 3 ml der Lösung 3 werden die Ansätze verschlossen 15 min in einem siedenden H_2O -Bad erhitzt.

Danach werden die Proben 5 min in ein kaltes H_2O -Bad gestellt, mit 4,3 ml Cyclohexanon versetzt, 2 x geschüttelt und zentrifugiert.

In der Cyclohexanonphase wird die Extinktion bei 546 nm gemessen.

14. Auftrennung von Zellüberständen mit Hilfe der Gelchromatographie

Yoshidazellen, die wie üblich 5 x gewaschen waren und auf die Äscin im H₂O-Schüttelbad bei 37°C 7, 15 oder 30 min eingewirkt hatte, wurden abzentrifugiert (Christkühlzentrifuge 10 min, 5000 Rpm). Die verbleibenden Überstände wurden gefriergetrocknet und gewogen. Ein Aliquot, in wenig H₂O gelöst, wurde auf eine Chromatographiesäule gebracht (Füllhöhe 70 cm, Durchmesser 2 cm).

Die Fraktionierung verlief wie beim Fettgewebe beschrieben. Wieder wurden die Fraktionen, die bei der Extinktionsmessung einen Gipfel bildeten, vereinigt und gefriergetrocknet. In den erhaltenen Proben wurde der Gehalt an Protein, Zucker und Sialinsäure bestimmt.

Zum Vergleich wurden entsprechende Proben der Überstände von Trypsin- bzw. Neuraminidase-behandelten Zellen mit der Sephadexsäule fraktioniert.

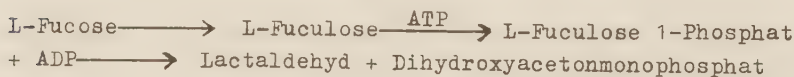
15. Versuche zur Markierung und zum Wiederaufbau von abgelöstem Oberflächenmaterial

Die Synthese von Glykoproteinen der Membran erfolgt aus Produkten, die aus den Golgi-Apparaten der Zelle stammen (Gasic G. und Gasic T., 1960; Bennett, 1970; Wise und Flickinger, 1970; Whaley et al., 1972). Zur Bildung von Coatmaterial in vitro lassen sich jene markierten Zucker heranziehen, die als natürliche Bausteine des Coats auftreten. Da aber der Zusatz von Galaktose, Mannose, Galaktosamin und Glukosamin zum großen Teil Abbauprodukte liefert, Sialinsäure wegen ihrer negativen Ladung kaum oder nur ungenügend in die Zelle aufgenommen wird, eignet sich vor allem die 6-Desoxygalaktose (=Fucose) als Markierungssubstanz.

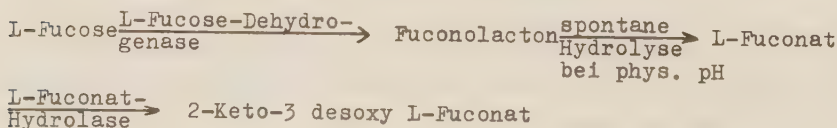
Fucose wurde als Baustein von Serumproteinen (Winzler, 1955), von Blutgruppensubstanzen (Heidelberger, 1956;

Kabat, 1956; Morgan und Watkins, 1959) und von Polysacchariden aus Bakterien gefunden und ist in vielen Glykoproteinen pflanzlicher und tierischer Gewebe vertreten (Bekesi und Winzler, 1967). Neben der N-Acetylneuraminsäure (=NANA) besetzt Fucose in den Glykoproteinen und Glykolipiden der Membran eine terminale Position (Watkins et al., 1962; Dische, 1963; Watkins, 1966; Glick et al., 1971). Nach Dische soll das Vorkommen von NANA und Fucose in reziprotem Verhältnis stehen.

Der Stoffwechsel der Fucose verläuft nach Spezies verschieden. Während beim Menschen ca. 40 % von $1-^{14}\text{C}$ -Fucose innerhalb von 6 h zu $^{14}\text{CO}_2$ abgebaut wird (Segal und Topper, 1957, 1960), beläuft sich dieser Prozentsatz bei der Ratte auf weniger als 2 % (Coffey et al., 1964; Bekesi und Winzler, 1967). Je 30 % wird unverändert durch den Harn ausgeschieden, der Rest wird als Fucose eingebaut. Der Abbau der Fucose im einzelnen wurde bisher nur für E.coli nachgewiesen (Ghalambor und Heath, 1962). Danach verlaufen die Abbauschritte wie folgt:



Eine weitere Abbaumöglichkeit für Fucose fanden Schachter et al. (1969) und Yuen und Schachter (1972) durch die Entdeckung von 2 Enzymen in der Schweineleber, die die Verstoffwechslung der Fucose einleiten:

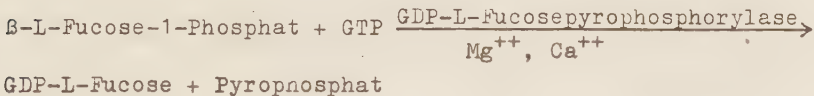


Der weitere Verlauf ist hierbei unbekannt, könnte jedoch wie bei Pseudomonas für D-Fucose zu Pyruvat und D-Lactaldehyd führen (Dahms und Anderson, 1969).

Neben dem Abbau der Fucose steht, wie für Ratten gefunden, der Einbau von Fucose in Glykoproteine im Vordergrund. Aus Lebern von Ratten und Schweinen wurde das Enzym L-Fucosekinase isoliert (Ishihara und Heath, 1968), das den ersten Schritt veranlassen soll:



Als 2. Schritt wird von Ishihara und Heath (1968) vorgeschlagen:



Das geforderte Enzym isolierten die Autoren ebenfalls aus Schweinelebern. Als GDP-L-Fucose gelangt der Zucker schließlich an die entsprechende Bindungsstelle des Glykoproteins, wie Jabbal und Schachter (1971) für Blutgruppen zeigten. Der Mechanismus des Transfers von Fucose-markierten Glykoprotein von den Golgi-Apparaten an die Membran ist noch unbekannt.

Die Aufnahme von Fucose in die Zelle erfolgte, wie Bennett et al. (1970, 1971) an Zylinderzellen des Duodenums zeigten, in 2 min in die Bereiche der Golgi-Apparate. Im Verlauf der nächsten 20 min schloß sich die Markierung von Oberflächenbestandteilen an, wie sich mittels Elektronenmikroskop-Autoradiographie feststellen ließ. Fucose erwies sich als potente Markierungssubstanz für kohlenhydratreiche Oberflächenbestandteile.

Y.A.T.Z., die 3 x mit Ringerphosphatmedium gewaschen waren, wurden 1 h mit $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Fucose bei 37°C im Schüttelbad inkubiert. Danach wurden die Zellen 2 x mit Medium gewaschen und 7 -15 min durch Zusatz von Äscin, Trypsin und Neuraminidase behandelt. Die Überstände mit freigesetzter Radioaktivität wurden in einigen Fällen dialysiert und zur Charakterisierung mittels der isoelektrischen Fokussierung und der Säulengelchromatographie untersucht.

Nach dem Entfernen und 2 x Auswaschen der oberflächenaktiven Stoffe Äscin, Trypsin und Neuraminidase schloss sich eine 40 min - Inkubation der Zellen an, währenddessen die Abgabe von ^{14}C -markierten Material gemessen wurde. Der Zuckergehalt der freigesetzten Substanz wurde nach der Anthronmethode, der Proteingehalt nach Lowry ermittelt.

16. Regenerierung von abgelöstem Membranmaterial (mit und ohne vorhergehende Markierung durch Fucose)

Wie üblich vorbereitete Yoshidazellen wurden nach Erwärmen auf 37°C 7 min mit Äscin, Trypsin und Neuraminidase inkubiert. Nach 2 x Waschen der Zellen zur Entfernung der oberflächenaktiven Stoffe wurden die Zellen 2 h mit $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glukose bzw. $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glukosamin inkubiert. Zum einen wurde der Transport der mit Äscin, Trypsin und Neuraminidase versetzten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen untersucht, zum anderen sollte durch den radioaktiven Zusatz nachgebildetes Oberflächenmaterial markiert werden.

Der Glukosetransfer in die Zelle während der 2 h wurde, wie bereits früher beschrieben, an Hand des radioaktiven Gehalts in den Zellen, der Glukoseabnahme im Medium und

der gleichzeitigen CO_2 -Entwicklung gemessen.

In einer weiteren Inkubation (15 min) wurden die Zellen schließlich mit Trypsin versetzt, um das eventuell neugebildete markierte Oberflächenmaterial abzulösen.

In einigen Fällen wurden in Abänderung der Versuchsanordnung Y.A.T.Z. vor der 7 min Behandlung mit Äscin, Trypsin und Neuraminidase 1 h mit $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Fucose vorinkubiert, um festzustellen, ob die in den Zellen verbliebene Radioaktivität während der 2 h-Inkubation auch zum Aufbau von Membranmaterial verwendet werden kann.

An Stelle von $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Fucose in der 1 h-Vorinkubation und $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glukose in der 2 h-Hauptinkubation wurde auch der markierte Aminosucker $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glukosamin zugesetzt, der ebenfalls wie Fucose als natürlicher Membranbaustein auftritt.

E. Ergebnisse:

I. Versuche mit epididymalem Fettgewebe der Ratten

1. Transport von Aminosäuren ins Fettgewebe

a. α -Aminoisobuttersäure

Nach Angaben von Goodman (1966) führte die Aufnahme der nicht metabolisierbaren Aminosäure

α -AiB ins Fettgewebe zu einer 6 - 13fachen Anreicherung im Zellinnern, was sich durch einen Anstieg des hypothetischen AiB-Raumes bemerkbar machte.

Die Wirkung von Äscin äußert sich je nach der Konzentration verschieden. Bei Äscinkonzentrationen oberhalb von $1 \times 10^{-5} \text{M}$ wird der AiB-Raum kleiner als unter Kontrollbedingungen. Bei geringeren Äscinkonzentrationen läßt sich keine Steigerung der AiB-Aufnahme feststellen. Allerdings erhöht sich mit wachsender Äscinkonzentration gleichzeitig der Wert für den ECR, was einem Anstieg des Wasservolumens im Gewebe entspricht (Tabelle 2).

Der Wassergehalt von Fettgewebe, das 2 h inkubiert war, wurde mit $20,8 \mu\text{l}/100 \text{ mg}$ Fettgewebe ermittelt. Daraus ist ersichtlich, daß der größte Anteil des Zellwassers sich extrazellulär befindet (Tabelle 3).

b. $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glycin

Der Einstrom von Glycin wurde analog der AiB-Aufnahme aus der im Gewebe enthaltenen Radioaktivität und außerdem indirekt an Hand des aus $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glycin beim Stoffwechsel entstandenen $^{14}\text{CO}_2$ bestimmt.

Tabelle 2:

Einfluß der Äscinkonzentration auf den Intra- und Extrazellulärraum bei
2 h-Inkubation

Äscin	—	3×10^{-5}	1×10^{-5}	3×10^{-6}	1×10^{-6}	3×10^{-7}
ICR ($\mu\text{L}/100 \text{ mg}$ Gewebe)	$51,8 \pm 7,5$	$24,0 \pm 5,3$	$39,7 \pm 2,9$	$51,8 \pm 3,6$	$53,6 \pm 2,2$	$47,9 \pm 3,3$
Hemmeffekt %	—	$53,7 \pm 10,3$	$23,4 \pm 5,6$	—	—	—
• Äscin	—	$2,5 \times 10^{-5}$	5×10^{-4}			
ECR ($\mu\text{L}/100 \text{ mg}$ Gewebe)	$21,7 \pm 0,6$	$32,9 \pm 1,5$	$26,9 \pm 1,5$			

Die Werte für den IC-Raum wurden aus 3 Versuchen mit je 4 Einzelwerten für eine Konzentration ermittelt. Die ECR-Werte stammen aus einem Versuch mit je 5 Ansätzen für eine Konzentration.

Bei der CO_2 -Bildung erzielte unter den Versuchsbedingungen (Glukosezusatz 1 mg/ml) weder Insulin (3 mE/ml) noch Äscin eine Steigerung (Tabelle 4). Dagegen fanden Herrera und Renold (1960) bei einer 30-fach höheren Insulinkonzentration (100 mE/ml) eine ca. 40 % größere CO_2 -Bildungsrate aus Glycin. Äscin in einer Konzentration von $3 \times 10^{-5}\text{M}$ und in geringem Maß von $1 \times 10^{-5}\text{M}$ hemmten den Vorgang der CO_2 -Erzeugung.

Die Aufnahme von Glycin in das Fettgewebe wurde durch Insulin (3 mE/ml) während der 2 h-Inkubation um etwa 35 % gesteigert (Tabelle 4). Herrera und Renold fanden ca. 40 % bei einer Konzentration von 100 mE/ml Insulin. β -Äscin ($3 \times 10^{-6}\text{M}$ bzw. $1 \times 10^{-6}\text{M}$) erhöhte die Glycinkorporation nur geringfügig um ca. 15 %, während Konzentrationen von $3 \times 10^{-5}\text{M}$ eher hemmten.

c. L-Leucin ($\text{U-}^{14}\text{C}$)

Analog zu den Ergebnissen für Glycin wird die CO_2 -Bildung auch aus Leucin durch Äscin nicht erhöht (Abb. 4). Mit wachsender Äscinkonzentration (ab $1 \times 10^{-5}\text{M}$) zeigte sich wieder der bekannte Hemmeffekt. Einen ebenfalls hemmenden Einfluß (ca. 25 %) auf die CO_2 -Entwicklung übt auch Insulin (3 mE/ml) aus. Dieser Befund deckt sich mit den Ergebnissen von Goodman (1964).

Bei dem Transfer von Leucin (Abb. 5) erzielt Insulin ähnlich wie bei der Glycinaufnahme eine etwa 55 % Steigerung und Äscin eine Erhöhung von etwa 25 %. Die Insulinwerte entsprechen den Beobachtungen von Goodman (1964).

2. Zuckertransport ins Fettgewebe

a. Einwirkung von Äscin auf den Glukosetransport

Die Inkubation von epidydimalen Fettgewebe in glu-

Tabelle 3:

Bestimmung des Wassergehalts in 100 mg Fettgewebe

Feuchtgewicht	Trockengewicht	H ₂ O/100 mg Feuchtgewicht
331	257,5	22,2
264	205,3	22,2
290	233,7	19,4
337	261,4	22,4
339	261,6	22,8
272	212,1	22,0
281	220,3	21,6
219	174,3	20,4
259	203,7	21,4
294	235,3	20,0
271	215,2	20,6
250	204,4	18,2
250	201,1	19,6
312	251,1	19,5
257	206,1	19,8
280	223,4	20,2
316	244,5	22,6
252	196,4	22,1

Mittelwert: $20,9 \pm 0,3$

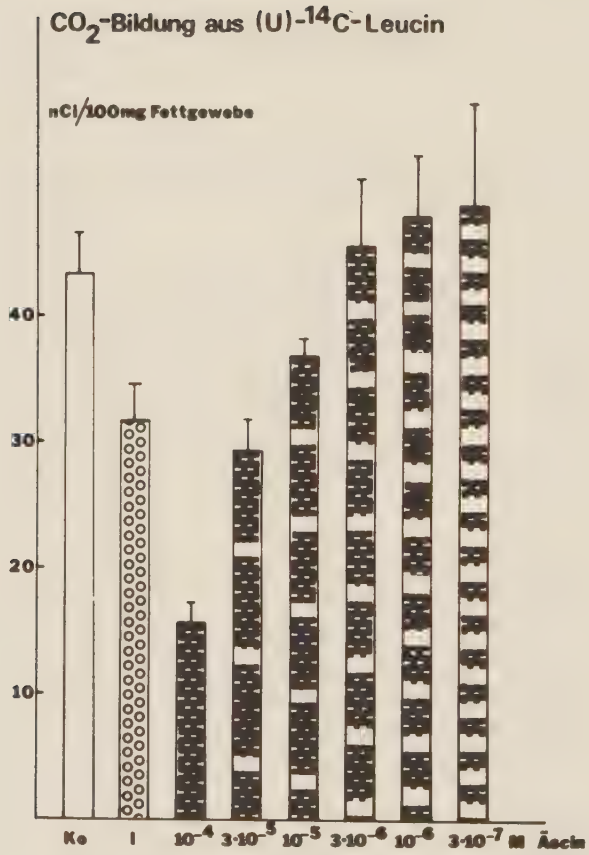


Abb. 4

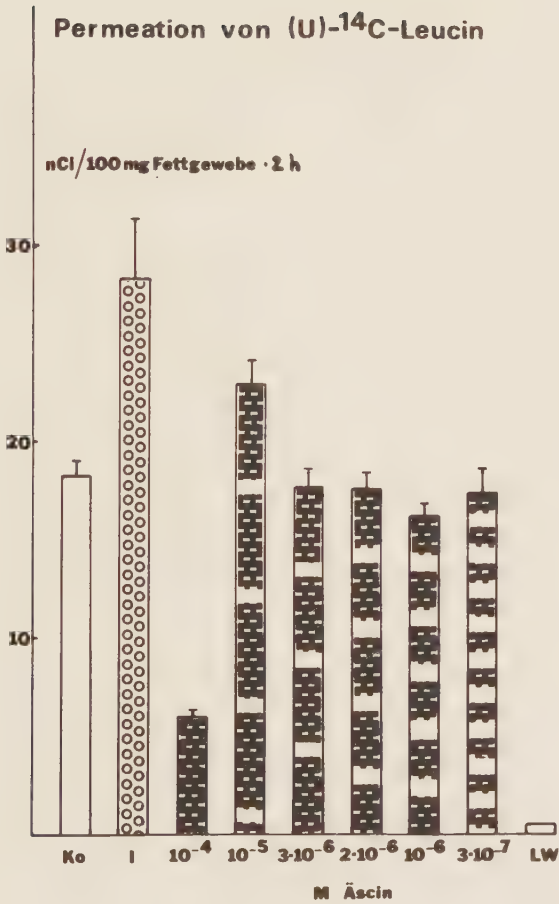


Abb. 5

kosehaltigem Medium führt nach Winegrad und Renold (1958) zu einer linearen Abnahme der Glukosekonzentration. Bei Verwendung von $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glukose läßt sich der Verbrauch auch indirekt an Hand von gleichzeitig gebildetem $^{14}\text{CO}_2$ nachweisen.

Äscin zeigt in seiner Wirkung auf die CO_2 -Entwicklung je nach Konzentration ein unterschiedliches Verhalten (Abb.6). Konzentrationen $3 \times 10^{-5}\text{M}$ offenbaren einen hemmenden Charakter, während kleinere Konzentrationen eine stimulierende Wirkung ausüben. Der relative Äscineffekt bezogen auf Kontrollwerte (= 100 %) weist abhängig von der Konzentration einen Kurvenverlauf auf, der bei etwa $6 \times 10^{-6}\text{M}$ durch ein Maximum führt. α -Äscin, β -Äscin und hydriertes Äscin zeigen analog es Verhalten, jedoch ist die Größe und die Lage des Maximums der Stimulation unterschiedlich. Die maximale Stimulation erfolgt durch α -Äscin bei $3 \times 10^{-5}\text{M}$, durch β -Äscin bei $8 \times 10^{-6}\text{M}$ und durch hydriertes Äscin bei einer Konzentration $> 10^{-3}\text{M}$. Durch diese "Äscine" erfolgt eine etwa 3-fache Steigerung der CO_2 -Entwicklung gegenüber Kontrollwerten. Das hydrolysierte, schwerlösliche Produkt Äscinol ist praktisch wirkungslos.

Die Darstellung von β -Äscin und α -Äscin, bzw. α -äscinhaltigem Material durch kurzzeitiges Erhitzen nach Wagner und Bosse (1960) stellt einen irreversiblen Vorgang dar. In Abb.7 zeigen in ihrer Zusammensetzung willkürlich hergestellte Mischungen aus α -Äscin und β -Äscin hinsichtlich ihres Einflusses auf die CO_2 -Bildung aus Glukose im isolierten Fettgewebe die Merkmale der Einzelprodukte und in keinem Fall das Verhalten der Ausgangssubstanz Äscin.

b. Die Wirkung von Insulin auf den Glukosetransport

Der stimulierende Einfluß von Insulin auf den Glukosetransport ins Fettgewebe ist seit langem be-

Tabelle 4 :

Einfluß von Insulin und β -Äscin auf die Permeation von Glycin und auf die CO_2 -Bildung aus Glycin:

	Ko	I			β -Äscin		
		β ME/ml	$3 \times 10^{-5} \text{M}$	10^{-5}M	$3 \times 10^{-6} \text{M}$	10^{-6}M	
Radioaktivität im Fettgewebe (nCi/100 mg Gewebe x 2 h Inkubation)	$5,36 \pm 0,09$	$7,25 \pm 0,13$ P 0,0002	$3,08 \pm 0,23$ P 0,0002	$5,16 \pm 0,26$	$6,13 \pm 0,21$ P 0,18	$6,06 \pm 0,27$ P 0,06	
Änderung in %(Kontrollwert = 100%)		$+35,2 \pm 2,4$	$-42,5 \pm 4,3$	-	$+14,5 \pm 4,0$	$+13,0 \pm 5,1$	
$^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung (nCi/100 mg Fettgewebe x 2 h Inkubation)	$3,72 \pm 0,09$	$3,90 \pm 0,17$ -	$1,96 \pm 0,27$ P 0,0002	$3,80 \pm 0,28$	$3,96 \pm 0,25$ -	$3,99 \pm 0,26$ -	
Änderung in %(Kontrollwert = 100%)	-	-	$-47,4 \pm 7,3$	-	-	-	

Die Ergebnisse stammen aus 2 Versuchen. Die Mittelwerte wurden aus jeweils 5 bzw. 6 Einzelwerten gebildet.

WIRKUNGEN VON AESCINEN AUF DEN GLUCOSETRANSPORT INS ISOLIERTE FETTGeweBE

$^{14}\text{CO}_2$ -Bildung aus $(1\text{-}^{14}\text{C})$ -Glucose
(in nCi/2h/100 mg Fettgewebe)
Kontrollwert = 100 %

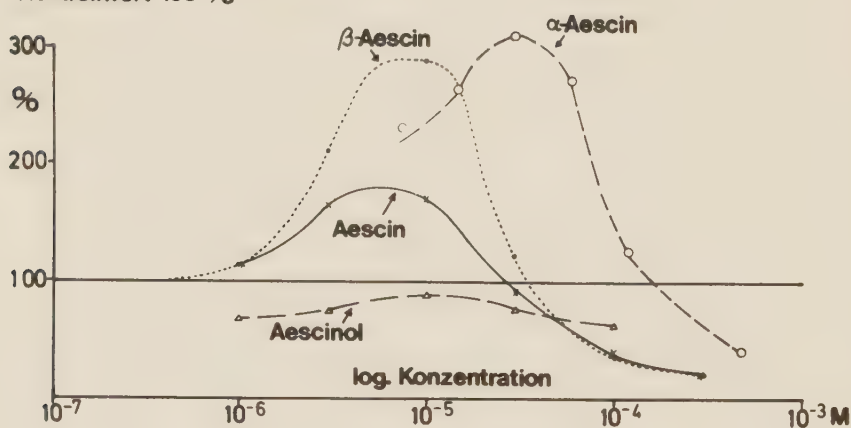


Abb. 6

Wirkung einer Mischung aus α - und β -Äscin auf die CO_2 -Bildung

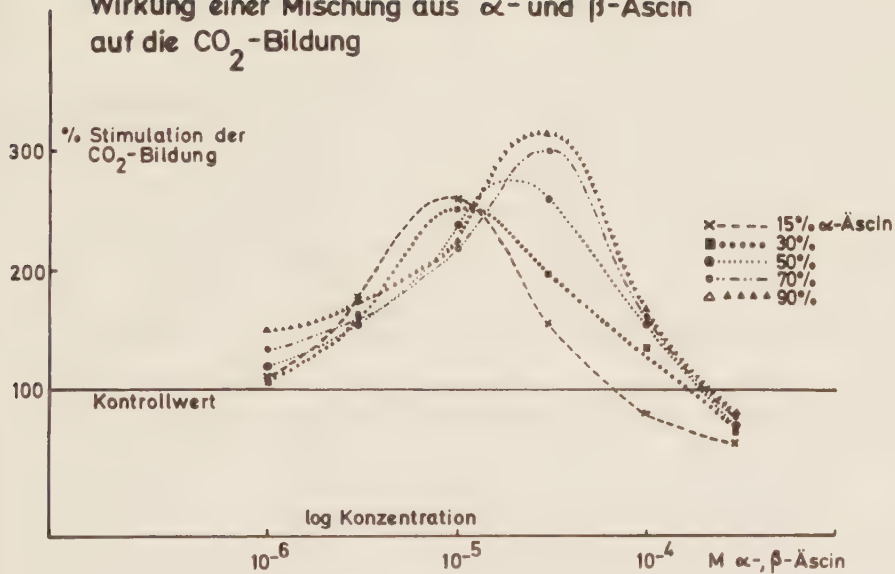


Abb. 7

kannt (Krahl, 1951; Itzhaki, 1957). Winegrad und Renold (1958) berichteten sowohl über eine Steigerung der Glukoseaufnahme als auch über eine beträchtliche Erhöhung der CO_2 -Bildung aus Glukose und über den vermehrten Einbau in die Fettsäuren der Lipide durch Insulin. Den Anteil der CO_2 -Bildung aus der aufgenommenen Glukose gaben sie mit ca. 30 % an.

Die Insulinversuche wurden durchgeführt, um die Wirkung von Insulin und Äscin miteinander zu vergleichen. Die Steigerung der CO_2 -Bildung aus Glukose durch Insulin ist in Abb.8 dargestellt. Bei Kristallinsulin durchläuft die Stimulation der CO_2 -Bildung auf Grund der steigenden Glukagonkonzentration ein Maximum, während Glukagon-freies Insulin die CO_2 -Bildung bis zu einem Grenzwert erhöht.

b. Einfluß von Äscin auf den Transport von Glukosamin

Die Aufnahme von $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glukosamin ins Fettgewebe und die Verstoffwechslung zu CO_2 in Abhängigkeit der Zeit sind in Abb.9 dargestellt. Die bei Glukose optimal stimulierende Äscinkonzentration von $6 \times 10^{-6}\text{M}$ steigert die Verstoffwechslung nur geringfügig, während Insulin in der gleichen Konzentration wie bei der Glukosestimulierung den Abbau von Glukosamin beträchtlich erhöht.

3. Reversibilität der Äscineffekte

Die Bindung von Äscin an das Fettgewebe besitzt nur schwachen Charakter. Durch mehrmaliges Waschen des Gewebes wird die stimulierende Wirkung von Äscin auf die CO_2 -Bildung nahezu beseitigt (Tabelle 5). Dagegen scheint Äscin in hemmenden Konzentrationen eine irreversible Schädigung des Gewebes hervorzurufen, da trotz des Waschvorganges die hemmende Wirkung auf die CO_2 -Entwicklung bestehen bleibt.

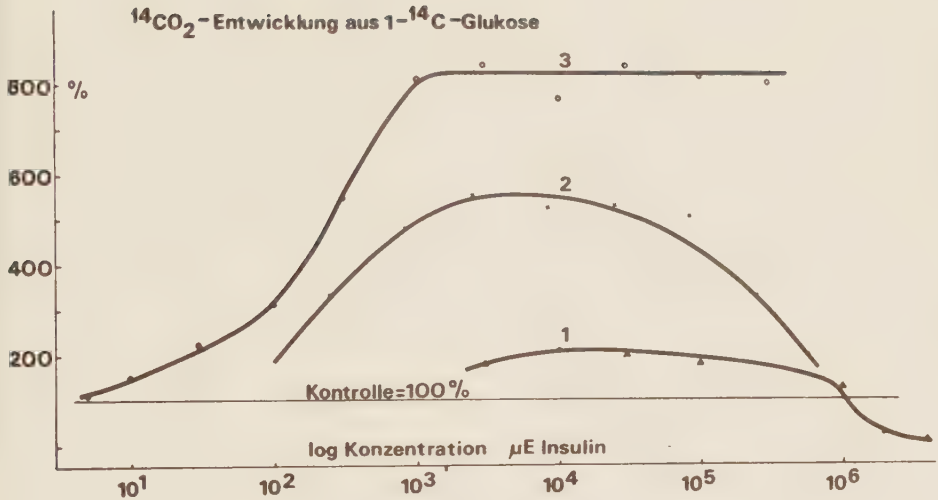


Abb.8: Stimulation der $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung aus $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glukose durch Insulin.

1 und 2: Wirkung von Kristallinsulin auf Fettgewebsproben von Ratten unterschiedlichen Alters

1: ca. 120 g schwere Ratten

2: über 250 g schwere Ratten

3: Glukagonfreies Insulin

Tabelle 5:

Versuche zur Reversibilität der Äscin-Effekte. Nach der Vorinkubation Mediumwechsel und Zusatz von 1-¹⁴C-Glukose (0,1 uCi/3 ml) (P-Werte gegen Kontrollansätze).

Äscin- konzentration	Äscinzusatz in		nCi/100 mg Fettgewebe	P-Wert
	Vorinkubation	Hauptinkubation		
			2,99 ± 0,16	
8 x 10 ⁻⁶ M	+		3,06 ± 0,06	
		+	4,26 ± 0,22	0,002
	+	+	3,71 ± 0,12	0,0066
6 x 10 ⁻⁵ M	+		0,82 ± 0,18	
		+	1,58 ± 0,18	0,0005
	+	+	0,49 ± 0,09	0,0002

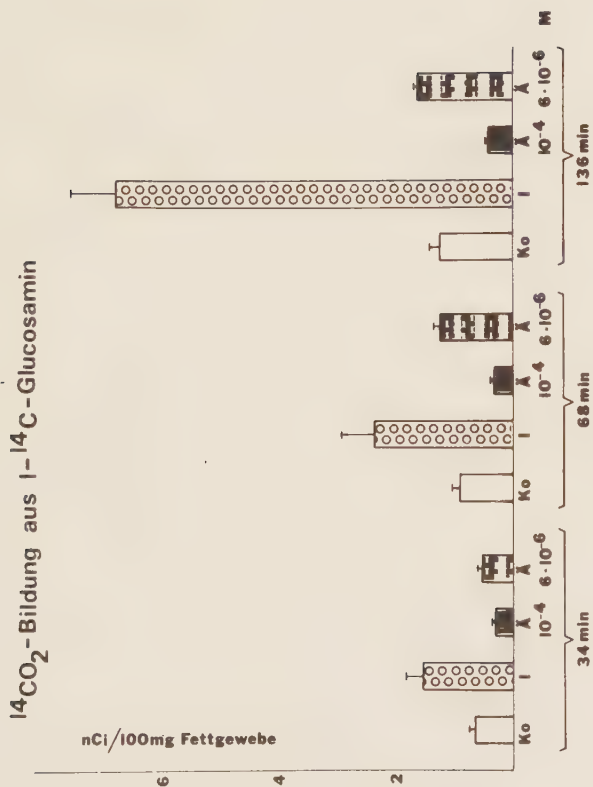


Abb. 9

Tabelle 6:

Transportkonstanten und maximale Geschwindigkeiten für Glukose (zur Abb. 10)
unter Äscin, α -Äscin und β -Äscin

Zusatz	K_T	$V_{\max}$ (nCi/2 h/ 100 mg Fettgewebe)		
		Kontrolle	Äscin stim.	Äscin hemm.
Äscin: $5,5 \times 10^{-6}M$ $10^{-4}M$	$4,9 \times 10^{-5}M$	3,57	10,0	1,0
α -Äscin: $2,5 \times 10^{-5}M$ $5 \times 10^{-4}M$	$4,5 \times 10^{-5}M$	4,51	5,27	0,9
β -Äscin: $8 \times 10^{-6}M$ $10^{-4}M$	$4,7 \times 10^{-5}M$	3,93	6,76	3,05

4. Kinetische Analyse des Glukosetransports

Die Inkubation von Fettgewebe führt bei steigender $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glukosekonzentration im Medium auch zu einer Erhöhung der $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung. Zur Charakterisierung der Kinetik des Glukosetransports wurden die zusammengehörigen Reziprokwerte in ein Diagramm (Abb. 10) nach Lineweaver-Burk (1934) eingetragen.

Die charakteristischen Größen K_T und $V_{\max}$ sind für Äscin, α -Äscin und β -Äscin in Tabelle 6 zusammengestellt. Aus den Koordinatenabschnitten läßt sich eine nicht kompetitive Hemmung des Transportvorganges ablesen.

5. Einfluß der Erdalkaliionen Mg^{++} und Ca^{++} auf die $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung aus $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glukose

a. 15 min Vorinkubation in Ca^{++} -, Mg^{++} - freiem Bicarbonatmedium (ohne Zusatz von EDTA)

Eine 15 min Vorinkubation von Fettgewebe in Ca^{++} -, Mg^{++} - freiem Medium übt einen Einfluß auf die CO_2 -Bildung während der nachfolgenden 2 h-Inkubation aus. Wird diesem vorinkubierten Gewebe in der Hauptinkubation wieder Ca^{++} zugesetzt (Abb. 11a), so erhöht sich bei Kontroll-, Insulin- und Äscinwerten die CO_2 -Bildung. Mg^{++} zeigte bei Kontroll- und Insulinproben ähnliche Wirkung (Abb. 12a), ohne jedoch die Äscinstimulierung zu ermöglichen. Die Kombination von Ca^{++} und Mg^{++} führte zu den höchsten absoluten Werten der CO_2 -Bildung (Abb. 13a), obwohl die Unterschiede zwischen den einzelnen Proben nicht ausgeprägt waren.

Ein weiterer Versuch (Abb. 14) zeigte, daß die Gegenwart der beiden Erdalkaliionen während der Hauptinkubation ohne die vorausgehende 15 min Inkubation in Ca^{++} -, Mg^{++} - freiem Medium keine Veränderung in der CO_2 -Bildung zur Folge hatte.

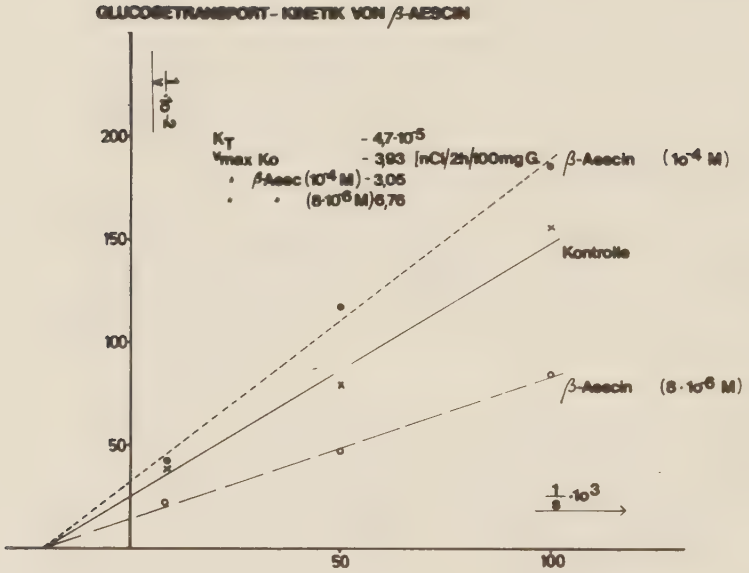


Abb.10: Lineweaver-Burk Diagramm

Abszisse: Reziprokwerte der Glukose-
konzentration des Mediums

Ordinate: Reziprokwerte der gebildeten
 CO_2 -Menge

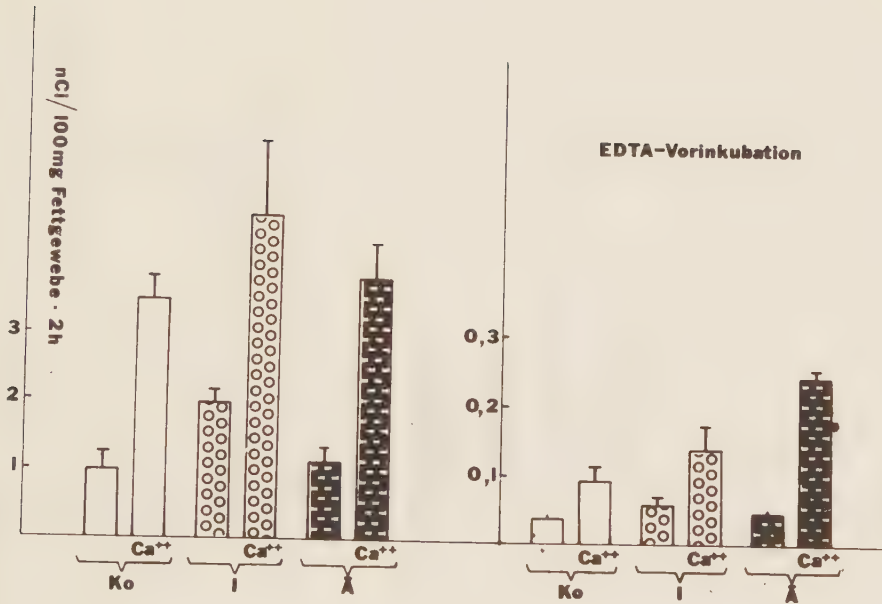


Abb. 11: Bildung von $^{14}\text{CO}_2$ aus $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glukose durch Fettgewebe während einer 2 h-Inkubation bei 37 °C.

a) (linke Hälfte der Abbildung)

Der 2h-Inkubation des Fettgewebes im Medium ohne und mit Ca^{++} -Zusatz ging eine 15 min-Vorinkubation im Ca^{++} - und Mg^{++} -freien Medium voraus.

b) (rechts)

Das Ca^{++} -, Mg^{++} -freie Medium der Vorinkubation enthielt zusätzlich 5 mM EDTA.

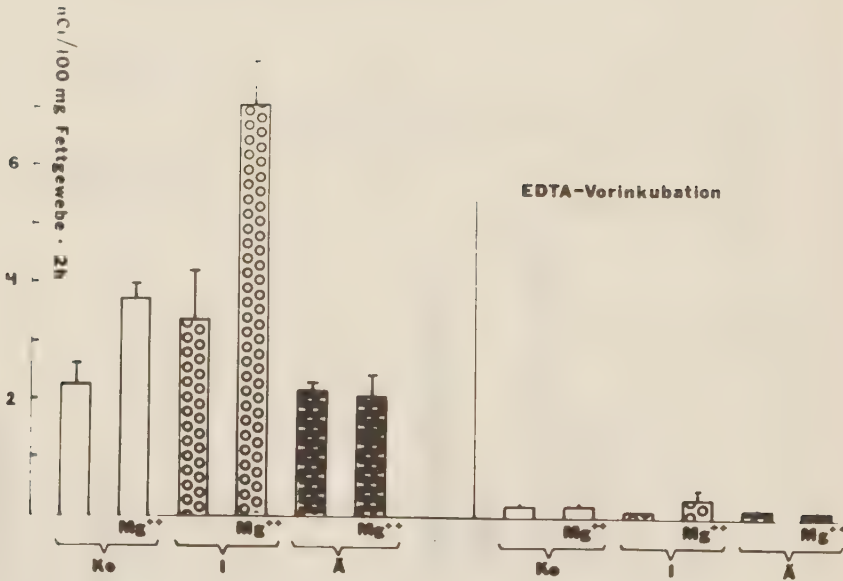


Abb. 12: Bildung von $^{14}\text{CO}_2$ aus 1- ^{14}C -Glukose durch Fettgewebe während einer 2h-Inkubation bei 37 °C.

a) (linke Hälfte der Abbildung)

Der 15 min-Vorinkubation im Ca^{++} -, Mg^{++} -freien Medium schloß sich eine 2h-Inkubation ohne und mit Mg^{++} -Zusatz an.

b) (rechts)

Das Ca^{++} -, Mg^{++} -freie Medium der Vorinkubation enthielt zusätzlich 5 mM EDTA.

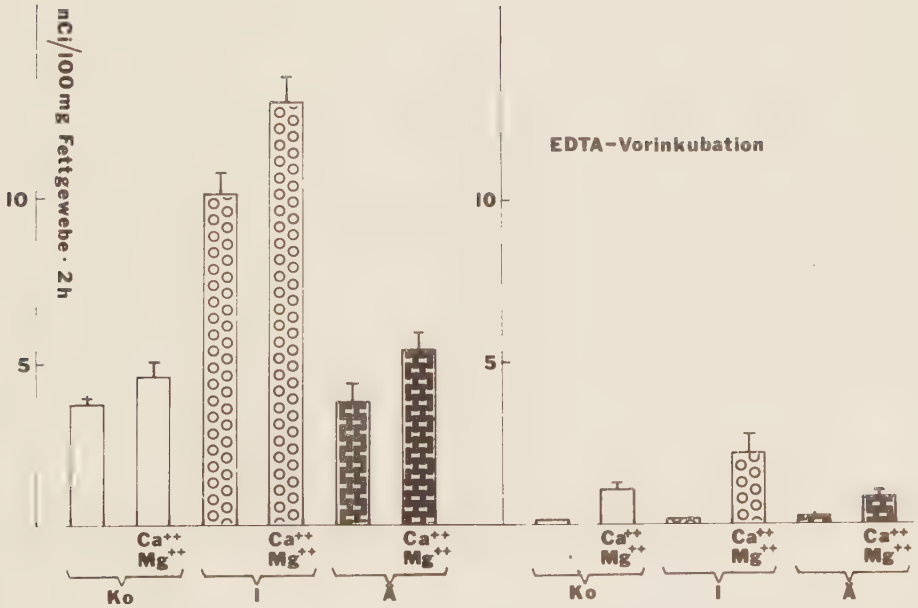


Abb. 13: Bildung von $^{14}\text{CO}_2$ aus $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glukose durch Fettgewebe während einer 2h-Inkubation bei 37°C .

a) (linke Hälfte der Abbildung)

Nach einer 15 min Inkubation im Ca^{++} -, Mg^{++} -freien Medium folgte eine 2h-Inkubation ohne und mit Ca^{++} - und Mg^{++} -Zusatz.

b) (rechts)

Das Ca^{++} -, Mg^{++} -freie Medium der Vorinkubation enthielt zusätzlich 5 mM EDTA.

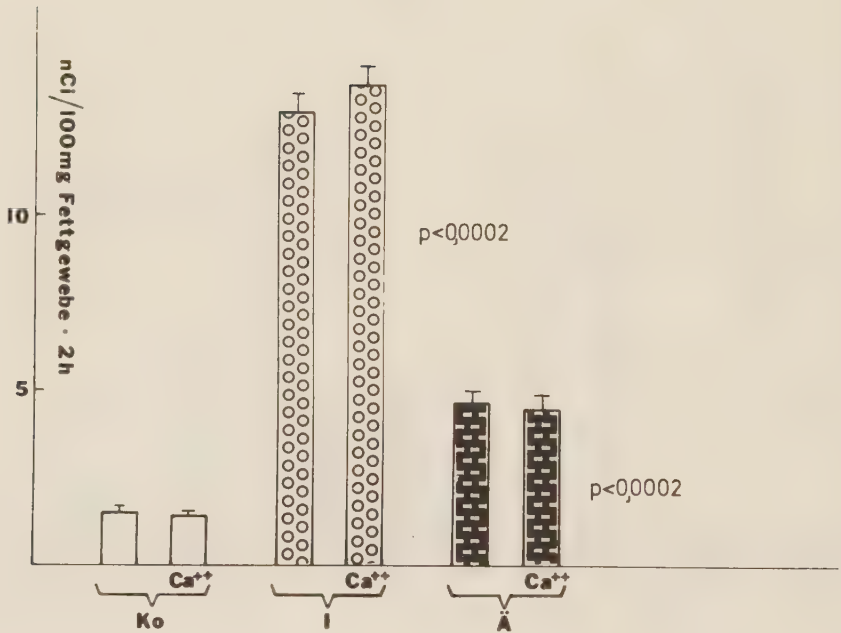


Abb. 14: Bildung von $^{14}\text{CO}_2$ aus 1- ^{14}C -Glukose während einer 2h-Inkubation von Fettgewebe bei 37 C. Die 2h-Inkubation ohne und mit Ca^{++} -Zusatz im Medium erfolgte ohne eine vorherige 15 min Inkubation im Ca^{++} - und Mg^{++} -freien Medium.

- b. 15 min Vorinkubation in Ca^{++} -, Mg^{++} - freiem Bicarbonatmedium (mit Zusatz von EDTA)

Die 15 min Vorinkubation von Fettgewebe mit EDTA in Ca^{++} -, Mg^{++} - freiem Bicarbonatmedium (Abb. 11b, 12b, 13b) führte während der nachfolgenden 2 h-Inkubation zu einer beträchtlichen Verringerung der CO_2 -Bildung. Diese Hemmung blieb nach Zusatz von 1,1 mM Mg^{++} bestehen (Abb. 11b) und konnte auch durch Insulin und Äscin nicht aufgehoben werden, obwohl Mg^{++} an sich nach der Vorinkubation ohne EDTA unter Kontrollbedingungen und Insulinstimulation höhere Werte ergab.

Ca^{++} -Zusatz jedoch (Abb. 12b) erhöhte den Glukoseverbrauch beträchtlich, wenn auch von einer kleinen Ausgangsbasis aus. Insulin und vor allem Äscin zeigen wieder ihre stimulierende Wirkung.

Die Gabe von Mg^{++} und Ca^{++} zusammen (Abb. 13b) erbrachte die höchste Normalisierungstendenz. Allerdings wurde die CO_2 -Produktion von Gewebe, das nicht mit EDTA behandelt war, bei weitem nicht erreicht.

6. Einwirkung von Äscin und Insulin auf die Lipolyse im Fettgewebe in vitro

Die mehrstündige Inkubation von Fettgewebe führte zur Freisetzung von meßbaren Mengen an Glycerin. Der Zusatz von Äscin (Abb. 15a) verringerte die Lipolyse und zwar bei der Konzentration $1 \times 10^{-5}\text{M}$ nur geringfügig um etwa 10 %, bei $1 \times 10^{-4}\text{M}$ aber um ca. 25 %. In dieser Größenordnung liegt auch der Hemmeffekt des Insulins (500 uE/ml).

Bei der Messung des gleichzeitig gebildeten CO_2 (Abb. 15b) zeigten sich wieder die bekannten Stimulationseffekte durch Insulin und Äscin.

Werden dem Inkubationsmedium, das 1 % Gelatine (zur Verringerung der Absorption von Insulin an die Glas-

wände, Ball et al., 1959) bzw. 4 % Albumin (Fain, 1962) enthielt, Dexamethason und Wachstumshormon zugesetzt, erhöht sich nach Fain et al. (1965) die Lipolyse beträchtlich. In analogen Versuchen (Abb. 16a) konnte eine Steigerung der Lipolyse von beinahe 60 % gefunden werden. Eine zusätzliche Insulin- bzw. Äscin-gabe verminderte diese erhöhten Lipolysewerte.

Erwartungsgemäß steigen die Werte der CO_2 -Entwicklung bei Insulin- und Äscinzusatz an (Abb. 16b).

7. Messung der Fluoreszenzintensität des Inkubationsmediums

Die Bestimmung der Fluoreszenz (Abb. 17) erbrachte mit steigender Inkubationsdauer eine nur geringfügige Erhöhung der Maxima der Emissionsspektren. Auf Grund der großen Streuung innerhalb des Anstiegs der Fluoreszenzintensität ließen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll-, Insulin- und Äscinwerten feststellen.

8. Auftrennung des Fettgewebsmediums über Sephadex G25 fine

Bicarbonatmedien, in denen Fettgewebsschleier 2 h bei 37°C im Schüttelbad unter Zusatz von Insulin (500 uE/ml) bzw. Äscin ($8 \times 10^{-6}\text{M}$ und $1 \times 10^{-4}\text{M}$) inkubiert waren, wurden gefriergetrocknet. Danach wurde das gewonnene Material wie beschrieben fraktioniert. In Abb. 18 sind die erhaltenen Extinktionsdiagramme zusammengestellt.

Pro Ansatz wurden auf Grund der Extinktionswerte in 5 - 7 Fraktionsbereiche aufgetrennt. Etwa 60 - 70 % des eingesetzten Materials wurde in den Absorptionsgipfeln wiedergefunden. Das nicht wiedergefundene restliche Material kann in den 2,5 ml Fraktionen jenseits der Fraktionsnummer 100 als kleinemolekulare Salze erwartet werden, deren Extinktionswert bei 260 nm gering ist.

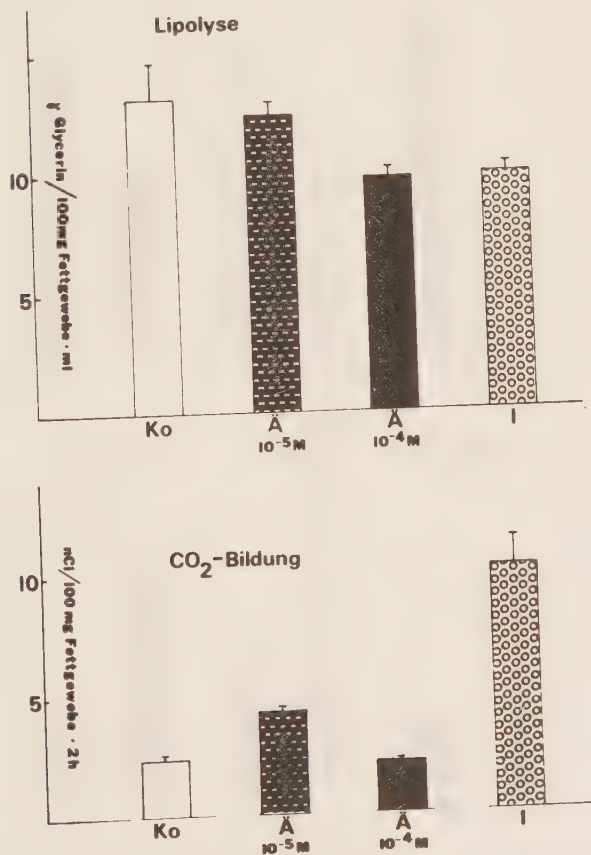


Abb. 15: Einfluß von Äscin und Insulin

- a. (oben)
auf den Lipolysevorgang
- b. (unten)
auf die CO₂-Bildung

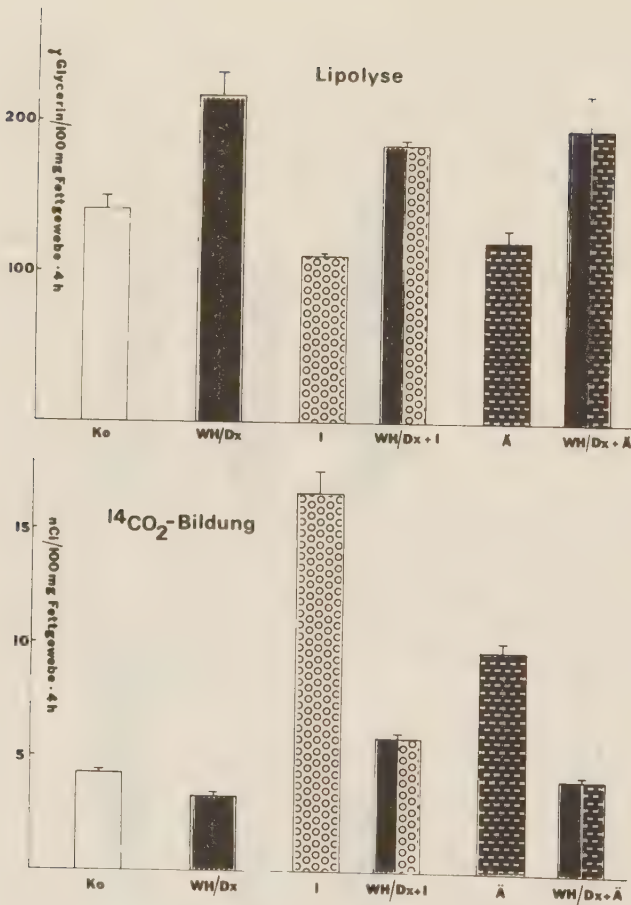


Abb. 16: a. (oben)

Einfluß von Äscin und Insulin auf den durch Wachstumshormon und Dexamethason stimulierten Lipolysevorgang

b. (unten)

Einfluß von Wachstumshormon und Dexamethason auf die durch Äscin und Insulin stimulierte $^{14}\text{C}_2$ -Bildung

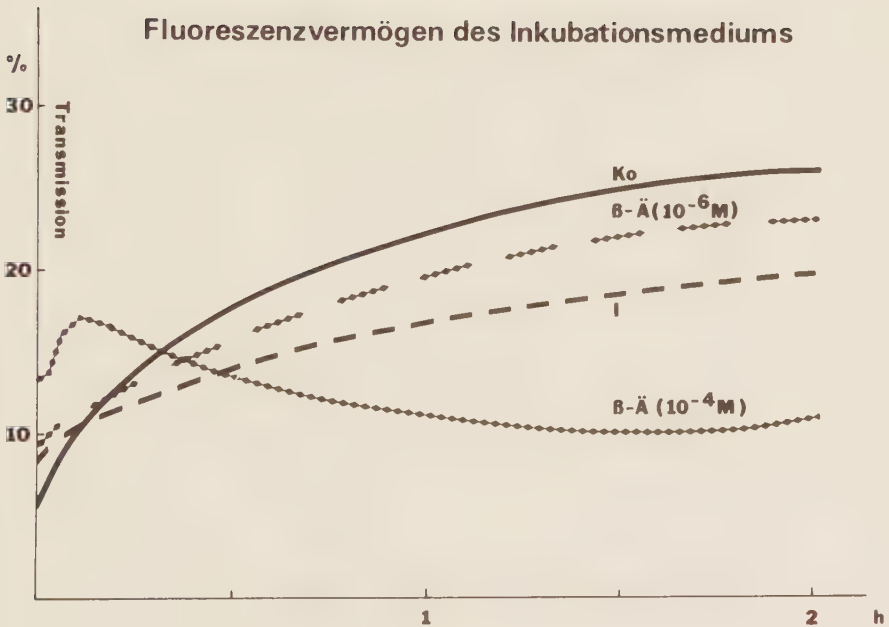


Abb. 17: Fluoreszenzvermögen des Mediums während einer 2h-Inkubation von Fettgewebe bei Einwirkung von Äscin und Insulin

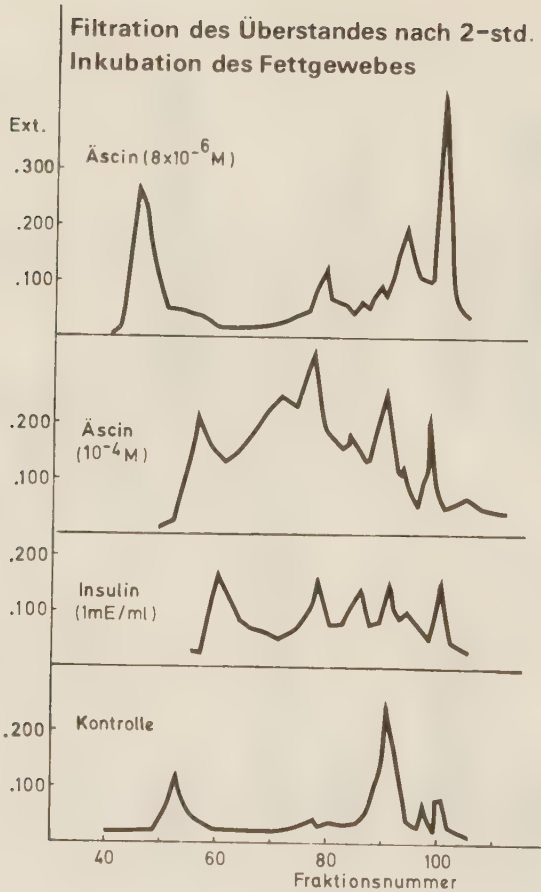


Abb.18: Auftrennung des Mediums mittels Säulenchromatographie (Sephadex G 25 fine). Das Fettgewebe war 2 h unter der Einwirkung von Äscin und Insulin inkubiert.

In Tabelle 7 ⁺⁾ sind spezifische Werte für die einzelnen Peaks, ihr Gehalt an Protein, Zucker und ihr Gewichtsanteil am wiedergefundenen Material zusammengestellt. In den 4 bzw. 5 Fraktionsbereichen ab Peak 5 (= Fraktionsbereich 5), die dem niedermolekularen Anteil entsprechen, stimmen die 4 Proben (Kontrolle, Insulin, Äscin $8 \times 10^{-6}M$, Äscin $1 \times 10^{-4}M$) im großen und ganzen überein, wobei nur die Prozentzahlen etwas differieren. In diesem Bereich befinden sich ca. 98 - 99 % des wiedergefundenen Materials. Daraus läßt sich auch erklären, daß bei der Fluoreszenzmessung des Inkubationsmediums keine markanten Unterschiede zwischen Kontroll-, Insulin- und Äscinwerten beobachtet werden konnten.

Bemerkenswert ist der hohe Zuckergehalt im Fraktionsbereich 7 bei Insulin mit 17,9 % und bei Äscin ($1 \times 10^{-4}M$) mit 20,4 %. Dieser hohe Zuckerwert rührt von der Glukose her, die vor der 2 h-Inkubation dem Medium zugesetzt und durch das Fettgewebe noch nicht verbraucht wurde. Auf Grund der Lage der Glukose hat man einen Anhaltspunkt, daß in diesem Bereich Substanzen mit einem ungefähren Molekulargewicht von 180 vorliegen.

Der niedrige Zuckeranteil von 3,1 % bei dem entsprechenden Kontrollwert und von 8,9 % bei dem Äscinwert ($8 \times 10^{-6}M$) wird durch die hohen absoluten Substanzmengen der betreffenden Fraktionsgruppen, sowie durch den Zuckergehalt der Nachbargruppe, wie es bei Äscin ($8 \times 10^{-6}M$) der Fall ist, wieder ausgeglichen, so daß man umgerechnet für alle 4 Ansätze eine ähnliche Menge an unverbrauchter Glukose erhält.

Die Unterschiede in den 4 Proben (Kontrolle, Insulin, Äscin $8 \times 10^{-6}M$, Äscin $1 \times 10^{-4}M$) beruhen vor allem auf der Lage der Peaks 1 - 4, u. h. auf der unterschiedlichen Größe der Molekulargewichte der betreffenden Bestandteile. Bei diesem Material, das einen Gewichtsanteil am wiedergefundenen Material von 1 - 2 % repräsentiert, steht die hohe Proteinkomponente im Vordergrund. Allerdings sind die Prozentzahlen auf Grund

⁺⁾ s. Anhang

des absolut sehr kleinen Gewichts mit einem relativ hohen Fehler behaftet.

9. Untersuchungen über ähnliches und unterschiedliches Verhalten von Äscin und Insulin in Bezug auf den Glukosetransport

a. Wirkung der Kombination von Insulin und Äscin auf den Glukosetransport:

Gleichzeitiges Einwirken von Insulin und Äscin (Abb.19) läßt die Ähnlichkeit der beiden Substanzen bei der Stimulation des Glukosetransports ins Fettgewebe zutage treten. Äscin in optimal stimulierenden Konzentration kann den durch Insulin gesteigerten Glukosetransfer nicht weiter anheben. Den durch Äscin gehemmten Glukosedurchtritt vermag Insulin aber nicht zu erhöhen.

b. Einfluß von 3-O-Methylglukose auf den durch Äscin bzw. Insulin stimulierten Glukosetransport:

Der nicht metabolisierbare Zucker 3-O-Methylglukose beeinträchtigt den Glukosetransfer ins Fettgewebe dadurch, daß er in Konkurrenz mit Glukose um dasselbe Transportsystem tritt (Crofford und Renold, 1965; Rodbell, 1966). Abb.20 zeigt, daß die Stimulation des Glukosetransports durch Insulin und Äscin durch 3-O-Methylglukose in gleicher Weise vermindert wird.

c. Wirkung von β -Mercaptoäthanol auf den durch Insulin und Äscin stimulierten Glukosetransport:

Den Einfluß der SH-haltigen Substanz β -Mercaptoäthanol auf den Glukosetransport ins Fettgewebe veranschaulicht die Abb. 21.

Läßt man β -Mercaptoäthanol in der Konzentration von $1 \times 10^{-3}M$, die selbst nur wenig wirksam ist, auf den durch Insulin bzw. Äscin erhöhten Glukosetransport einwirken (Tabelle 8), so erhält man eine Einschränkung der Stimulation bei Insulin, nicht aber bei Äscin.

EINFLUSS VON INSULIN AUF DIE $^{14}\text{CO}_2$ -BILDUNG AUS $[1^{14}\text{C}]$ -GLUCOSE UNTER AESCIN

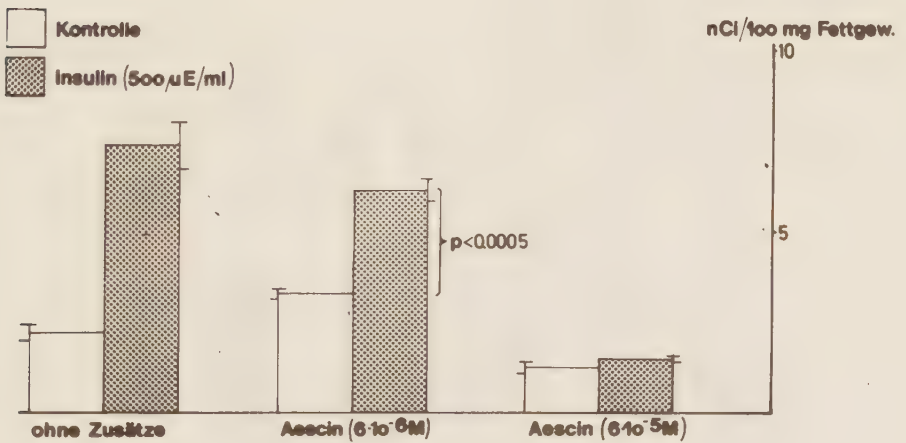


Abb.19: Einfluß von Insulin auf die Glukose-transportvorgänge unter Äscin

**EINFLUSS VON 3-O-METHYLGLUCOSE AUF DIE GLUCOSETRANSPORTVORGÄNGE
UNTER AESCIN UND INSULIN**

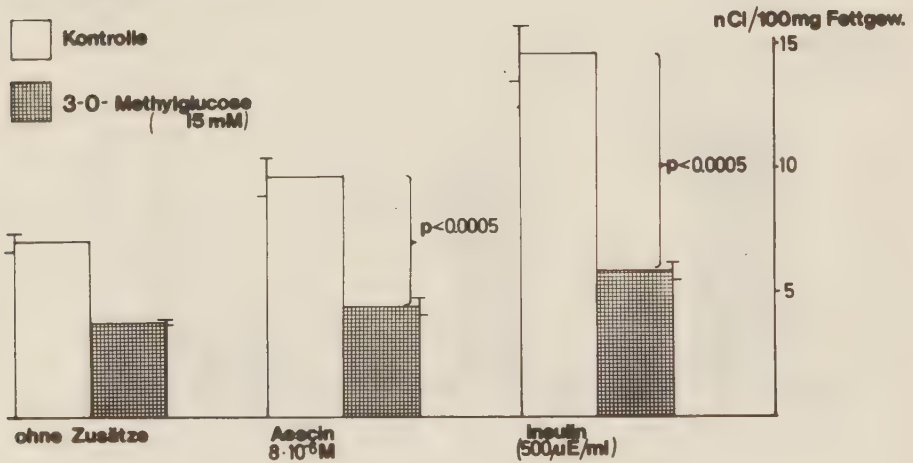


Abb.20: Einfluß von 3-O-Methylglukose auf die durch
Äscin und Insulin stimulierte CO_2 -Bildung

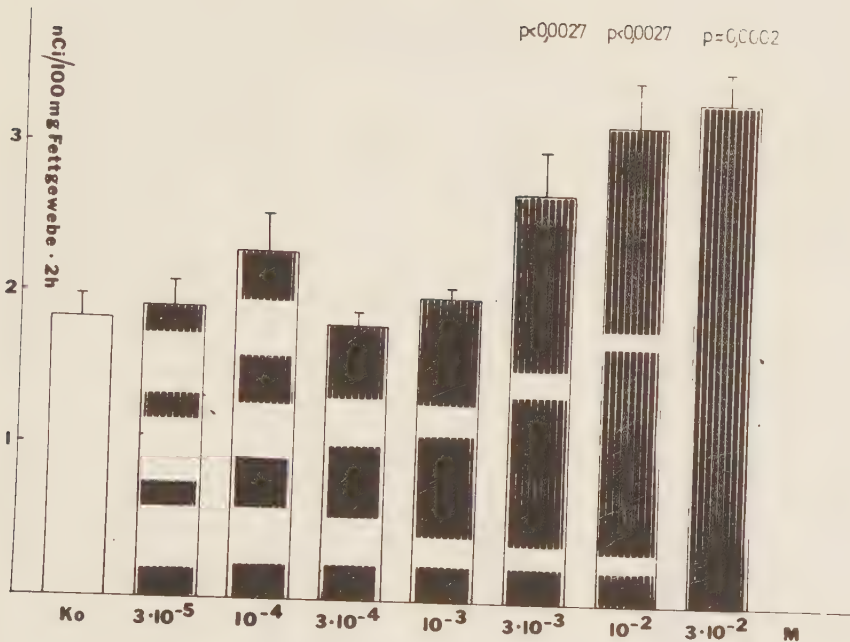


Abb. 21: Einfluß der Konzentration von β -Mercaptoäthanol auf die CO_2 -Bildung

Tabelle 3:

Einfluß von β -Mercaptoäthanol auf die durch Äscin oder Insulin stimulierte Glukoseaufnahme.

Z u s a t z

Äscin ($1,5 \times 10^{-5} M$)	Insulin (500 uE/ml)	β -Mercaptoäthanol ($10^{-3} M$)	nCi/100 mg Fettgewebe
		+	2,75 $\pm$ 0,20 2,88 $\pm$ 0,28
+		+	7,01 $\pm$ 0,17 7,24 $\pm$ 0,43
+	+	+	11,64 $\pm$ 0,67 7,02 $\pm$ 0,47

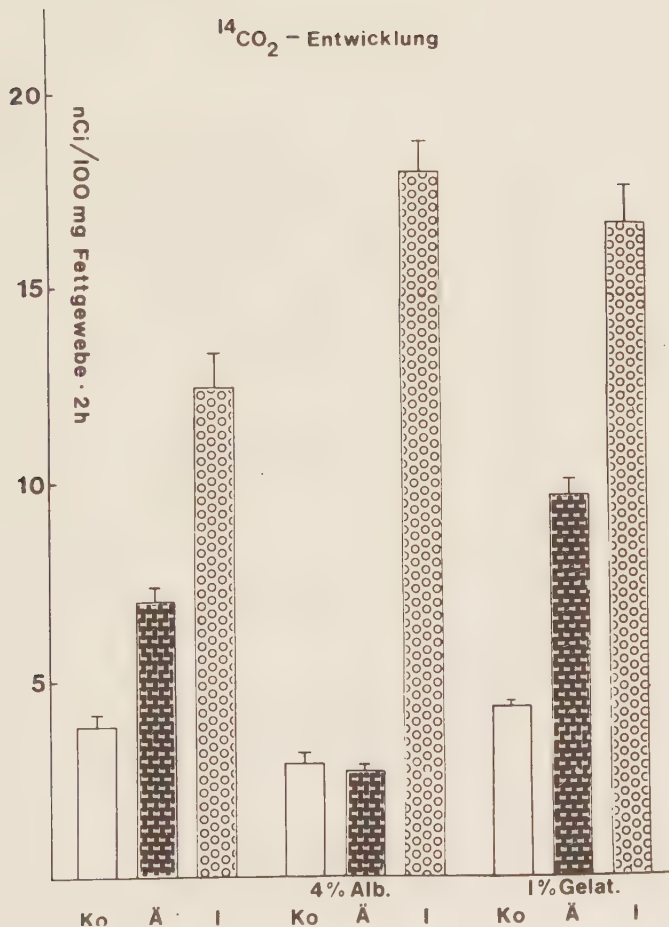


Abb. 22: Einfluß des Albumin- und Gelatinegehaltes des Inkubationsmediums auf die durch β -Äscin ($8 \times 10^{-6}\text{M}$) und Insulin (100 u E/ml) erhöhte CO_2 -Bildung

Tabelle 9:

Einfluß von 4 %-Albuminzusatz zum Inkubationsmedium auf die $^{14}\text{CO}_2$ -
Stimulation durch Äscin und Insulin aus 1- ^{14}C -Glukose

Ko	Alb	Ä	Ä + Alb	I	I + Alb
2,89	1,67	5,41	2,35	9,40	17,17
3,98	2,32	7,22	2,55	13,48	17,50
4,69	4,02	6,74	2,68	10,97	18,98
4,67	3,48	6,67	2,38	12,57	(14,08)
3,44	2,44	6,58	2,84	12,50	21,60
<u>3,23</u>	<u>3,32</u>	<u>5,26</u>	<u>3,12</u>	<u>15,83</u>	<u>18,55</u>
3,82	2,88	6,31	2,65	12,46	(18,76)
+ 0,31	+ 0,36	+ 0,32	+ 0,12	+ 0,89	+ 0,78

Die Werte bedeuten freigesetztes $^{14}\text{CO}_2$ in nCi pro 100 mg epididymales
Fettgewebe pro 2 h-Inkubationsdauer bei 37°C im H₂O-Schüttelbad.

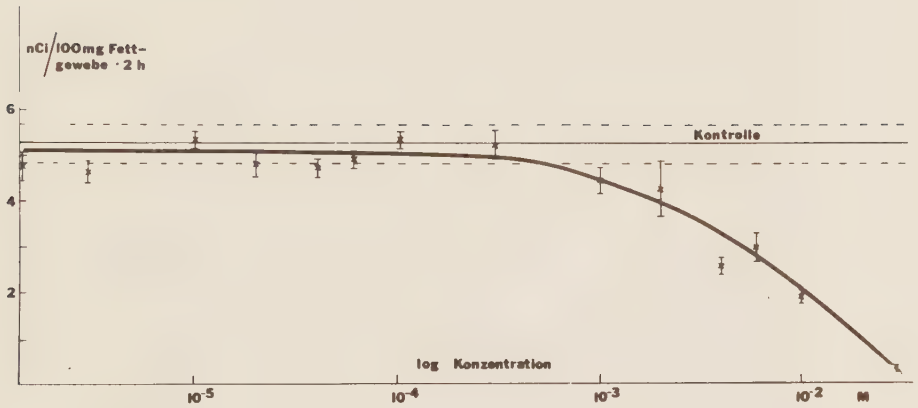


Abb. 23: Einfluß der Konzentration von Phenyläthanol auf die $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung aus 1- ^{14}C -Glukose

Einen ähnlich hemmenden Einfluß auf den Insulin-stimulierten Glukosetransport stellten Minemura und Crofford (1969) bei der SH-haltigen Substanz 2,3-Dimercaptopropanol fest.

- d. Einfluß von Gelatine (1 %) bzw. Albumin (4 %), die dem Bicarbonatmedium zugesetzt wurden, auf die durch Insulin bzw. Äscin verursachte Stimulation des Glukosetransports:

Die Anreicherung des Mediums mit Gelatine (1 %), die nach Ball (1959) die Absorption von Insulin an die Glaswände der Inkubationsgefäße verhindern soll, verringert die Stimulation der CO_2 -Bildung weder durch Insulin noch durch Äscin (Abb. 22).

Der Zusatz von Albumin (4 %), der im Medium gewöhnlich zur Stabilisierung von isolierten Fettzellen dient (Rodbell, 1964; Fain, 1962), beseitigt die durch Äscin verursachte Stimulation des Glukosetransports (Tabelle 9). Hierfür wird die besondere Bindung an Albumin verantwortlich zu machen sein (siehe Diskussion).

Insulin hingegen wird in seinem Einfluß auf die CO_2 -Bildung durch den Albumingehalt des Mediums nicht beeinträchtigt.

- e. Wirkung von Phenyläthanol auf die CO_2 -Bildung:

In Anlehnung an die Struktur des Äscins wurde Phenyläthanol als Modell für eine einfachste Substanz ausgesucht, die aus einem hydrophilen und einem hydrophoben Bestandteil besteht. Die Erwartung einer Stimulation der CO_2 -Bildung erfüllte sich nicht (Abb. 23). Eine Konzentrationsreihe mit Phenyläthanol zeigte lediglich ab einer Konzentration von $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ aufwärts Hemmeffekte. Für diese Substanz fand Plagemann (1970) bei Transportvorgängen in Novikoff-Hepatoma-Zellen ebenfalls einen hemmenden Einfluß. Die notwendigen Konzentrationen lagen im Bereich von $> 8 \text{ mM}$.

II. Versuche mit Yoshida-Ascitestumorzellen (Y.A.T.Z.)

1. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Y.A.T.Z.

Abb. 24 vermittelt das Bild einer Zelle, die 30 min in Ringerphosphatmedium inkubiert war. An der Membranoberfläche befinden sich zahlreiche Ausstülpungen, die sog. Mikrovilli. Außerdem läßt sich an der Membranoberfläche ein dünner Saum erkennen, der möglicherweise die kohlehydratreiche Schicht, den Coat darstellt.

Mit Äscin (Abb. 25) gehen abhängig von der Konzentration die Mikrovilli verloren. In der Umgebung der Zellen aber befindet sich kontrastreiches Material, das als Spaltprodukt aus den Mikrovilli stammen könnte. Ferner zeigt sich mit steigender Äscinkonzentration eine zunehmend deutliche Schädigung der gesamten Zelle, die in manchen Fällen zur teilweisen Auflösung der Membran und zur völligen Zerstörung der Zelle führt.

Die folgenden Untersuchungen sollen sich auf jene Veränderungen beschränken, die zu einem Zeitpunkt auftreten, an dem sich die Mehrzahl der Zellen als noch lebend erweist. Der Vitalitätsnachweis wurde mittels der Anfärbemethode mit Trypanblau erbracht.

2. Die Lebensfähigkeit von Y.A.T.Z. nach dem Einwirken von Äscin

Äscin führt, wie die elektronenmikroskopischen Aufnahmen gezeigt haben, bei längerem Einwirken zu einer ernsten Schädigung der Zelle. Als Folge einer Inkubation der Zellen mit Äscin ($3 \times 10^{-5} \text{M}$) im Schüttelbad bei 37°C treten bereits nach 10 min ca. 40 - 50 % tote Zellen auf, nach 15 min ca. 80 % und nach 30 min ist die Zerstörung der Zellen so gut wie vollständig.

Der Glukoseverbrauch bleibt bei kurzzeitiger (z. B. 7-minütiger) Inkubation mit Äscin und anschließendem Mediumwechsel unverändert. Trotzdem wird auch noch bei kürzerer Äscineinwirkung an der Zahl anfärbbarer Zellen eine Labilisierung der Zellen erkennbar (Abb. 26).

3. Transport von Aminosäuren

a. Aufnahme von Glycin

Wie beim Fettgewebe kann man als Maß für die Anreicherung von Aminosäuren in Y.A.T.Z. den Anstieg des entsprechenden Intrazellulär-raumes wählen. Die zeitliche Abhängigkeit des intrazellulären Glycin-raumes bei der Einwirkung von Äscin verschiedener Konzentrationen zeigt Abb. 27. Der graphischen Darstellung kann man entnehmen, daß die Sättigung der Zelle mit Glycin innerhalb von 4 - 5 min erreicht ist. Die hemmende Wirkung von Äscin setzt praktisch unmittelbar nach der Zugabe ein.

Eine nahezu lineare Beziehung zwischen dem Glycin-Raum und der Äscinhemmkonzentration ist erkennbar (Abb. 28a), wenn man die erreichten Werte 4 min nach Äscinzugabe zum Vergleich heranzieht. Zwischen Hemmwirkung und Äscinkonzentration ergibt sich eine Funktion höherer Ordnung mit Wendepunkt (Abb. 28b). Offensichtlich wird innerhalb eines sehr kleinen Konzentrationsbereiches die Hemmwirkung von 0 - 100 % erfaßt.

Den Einfluß von jeweils $3 \times 10^{-5}M$ Äscin, α -Äscin, β -Äscin, Äscinol und Äscigenin auf den Glycintransport zeigt Abb. 29. Bei der Wirkung von Äscinol und Äscigenin muß jedoch berücksichtigt werden, daß infolge der geringen Löslichkeit in wässrigem Medium sich die beabsichtigte Konzentration von $3 \times 10^{-5}M$ nicht erzielen ließ.



Abb. 24: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Yoshida-Ascitestumorzelle nach einer Inkubation von 30 min in Ringerphosphatmedium bei 37°C. Die Anfärbung erfolgte mit Ruthenium-Rot. Die Vergrößerung beträgt 28000.

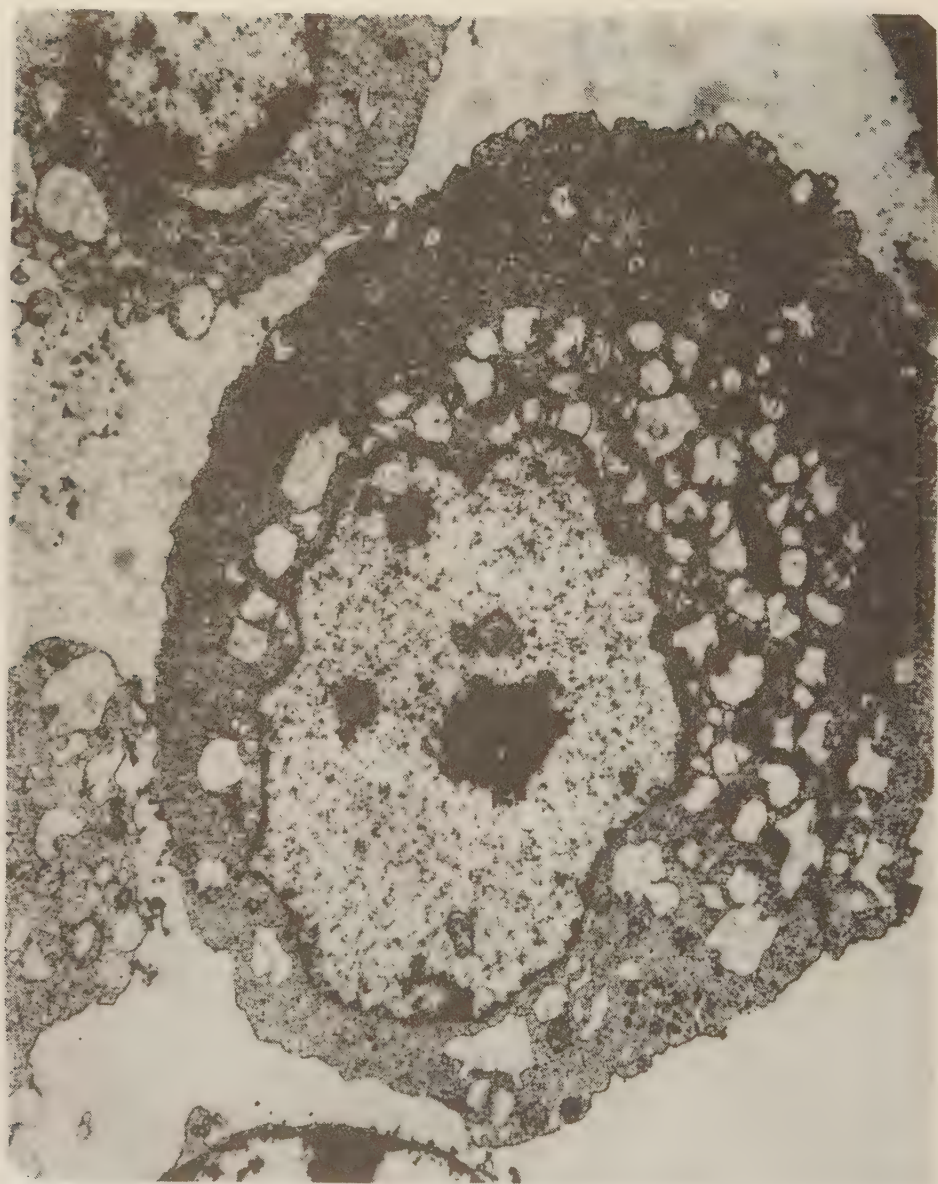


Abb. 25: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Yoshida-Ascitestumorzelle nach einer Inkubation von 30 min in Ringerphosphatmedium mit Äscinzusatz (3×10^{-7}) bei 37°C . Die Anfärbung erfolgte mit Ruthenium-rot. Die Vergrößerung beträgt 14000.

Zellzählung

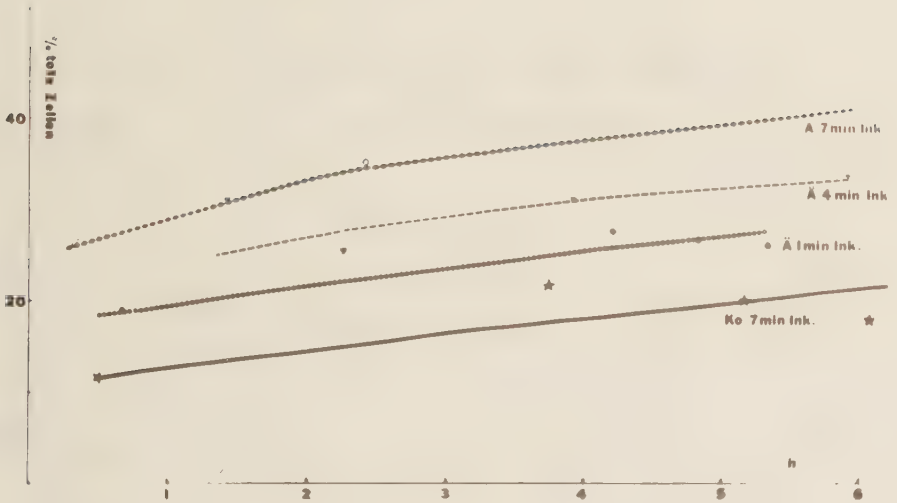


Abb.26: Einfluß der Einwirkungsauer von Ascin
auf die Lebensfähigkeit der Yoshidazellen

Beeinflussung des Transportes in Yoshida- Ascitestumorzellen durch Äscin

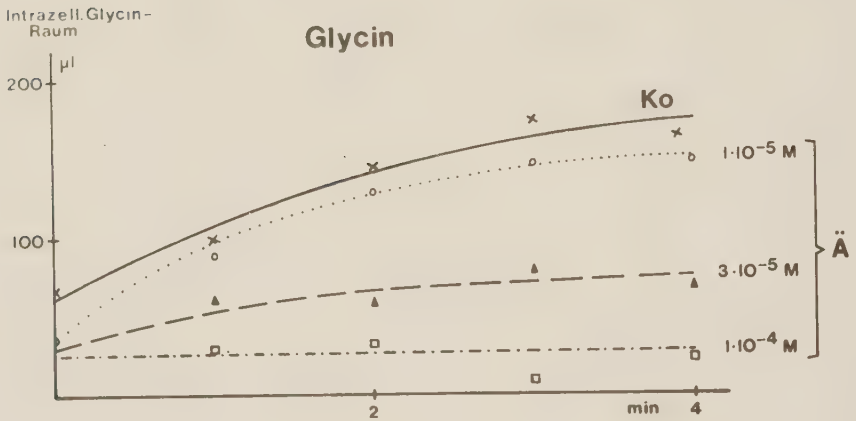


Abb. 27

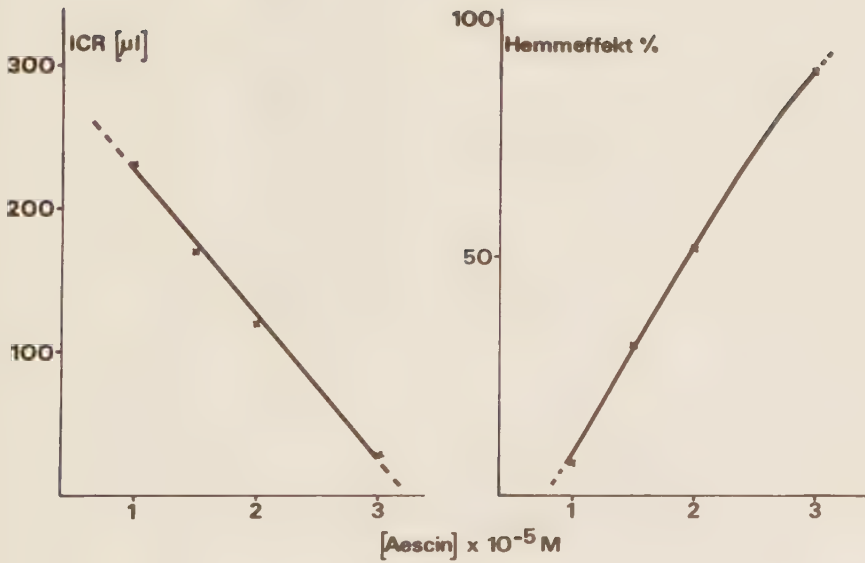


Abb.28: Einfluß der Äscinkonzentration auf die Aufnahme von Glycin in Y.A.T.Z.

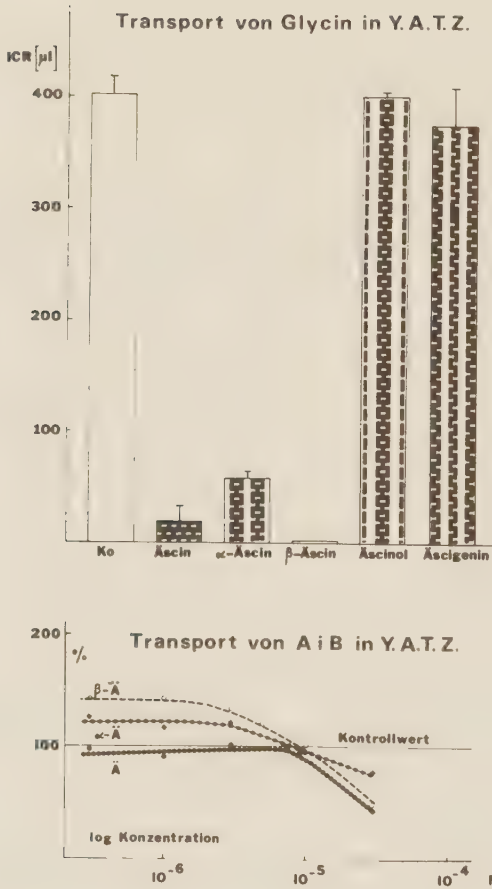


Abb.29: Einfluß von Äscin, α -Äscin, β -Äscin, Äscinol und Äscigenin auf den Glycintransport (die Konzentration betrug jeweils $3 \times 10^{-5} \text{ M}$).

Einfluß der Konzentration von Äscin, α -Äscin und β -Äscin auf den α -Aminoisobuttersäuretransport.

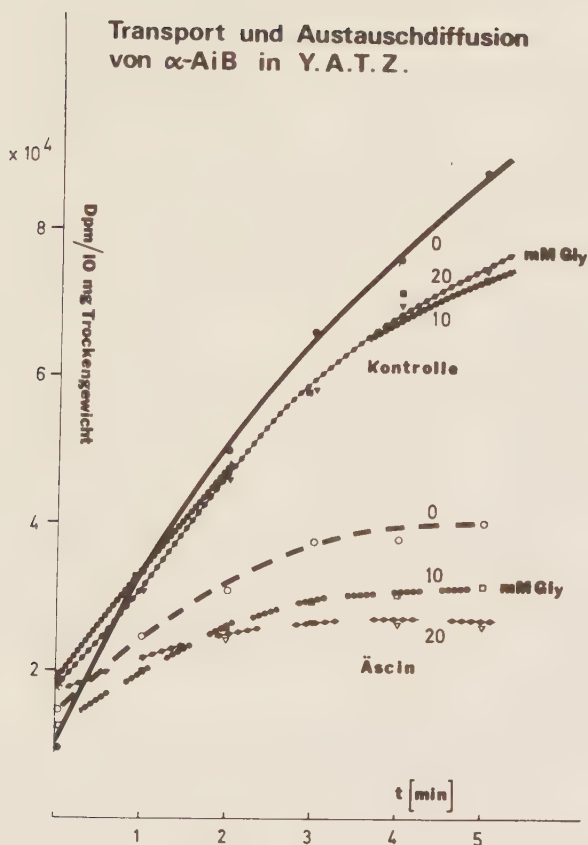


Abb.30: Einfluß von Äscin auf den Transport und die Austauschdiffusion von α -AiB. Für die Austauschdiffusionsversuche wurden die Zellen 30 min mit 10 mM und 20 mM Glycin vorbeladen.

b. Aufnahme von α -Aminoisobuttersäure in Y.A.T.Z.

Bei der Messung des Transports der nicht verstoffwechselbaren Aminosäure α -AiB in Y.A.T.Z. in Abhängigkeit von der Konzentration der verschiedenen Äscine wurden ähnliche Ergebnisse wie für den Glycintransport erhalten. Der Abb. 29 läßt sich entnehmen, daß sich die 3 Äscine mit ihrer Wirkung nur geringfügig unterscheiden.

Wegen der übersichtlicheren Verhältnisse wurde mit α -AiB auch die schnelle Austauschdiffusion unter Äscin untersucht (Abb. 30). Sie wurde von Heinz (1954) bei der Glycinaufnahme in Ehrlich-A.T.Z. nach Präinkubation mit Glycin beobachtet.

In der hier beschriebenen Versuchsanordnung konnte aber keine Erhöhung, sondern im Gegenteil nur eine Erniedrigung der α -AiB-Aufnahme gegenüber nicht vorbeladenen Zellen festgestellt werden. Dieses Ergebniss deutet darauf hin, daß bereits während der 5 min, die vor der Hauptinkubation zur Temperierung der Zellen dienten, ein Konzentrationsausgleich zwischen Zellinnern und Medium stattgefunden hat. Die Aufnahme der markierten Aminosäure in der Hauptinkubation wird dann durch die ausgeströmte, nicht markierte Säure behindert.

c. Transport von Leucin in Y.A.T.Z.

Der Vorgang der Aufnahme und der Austauschdiffusion von Leucin ist in Abb. 31 dargestellt. Die Sättigung der Zellen mit Leucin erfolgt danach innerhalb von 2 - 3 min, d. h. noch schneller als die Sättigung mit Glycin oder α -AiB. Im weiteren Verlauf verringert sich dann wieder die Aminosäurekonzentration in der Zelle. Dies dürfte auf die Verstoffwechselung von Leucin zu CO_2 zurückzuführen sein. Äscin ($3 \times 10^{-5} \text{M}$) vermindert den Einstrom von Leucin.

Die "Beladung" der Zelle mit nichtmarkiertem Leucin während der Vorinkubation führt in der Hauptinkubation innerhalb von 1 - 2 min zu einem Austausch zwischen markierter und nichtmarkierter Aminosäure. Der Vorgang der

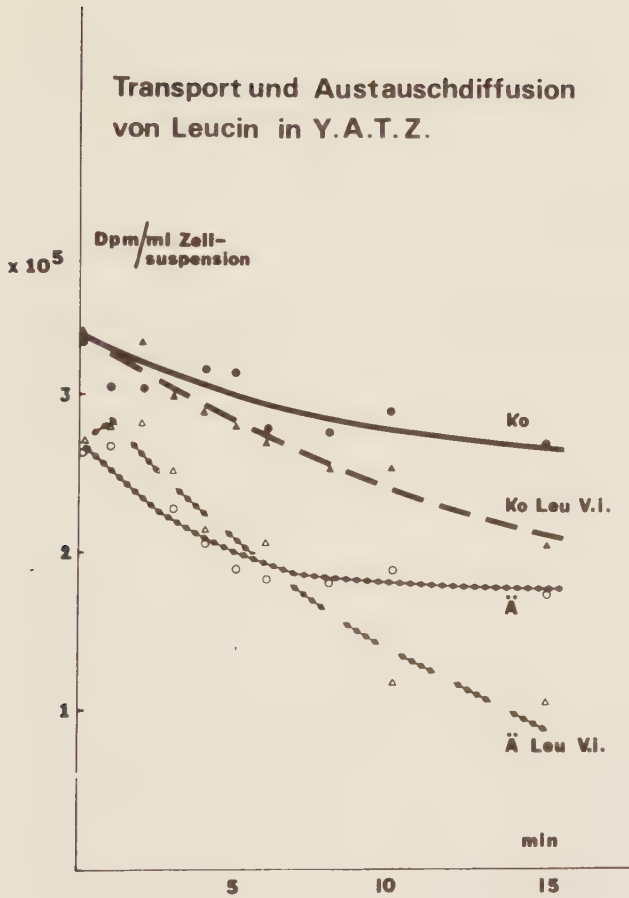


Abb.31: Einfluß von Äscin auf den Transport und die Austauschdiffusion von Leucin in Yoshidazellen

Austauschdiffusion erfolgt mit größerer Geschwindigkeit als die Aufnahme. Der steilere Abfall der ^{14}C -leucin-konzentration in der Zelle erklärt sich aus dem Verdünnungseffekt, der von der nichtmarkierten Säure herührt.

4. Glukoseverbrauch durch Y.A.T.Z.

a. Glukoseabnahme im Medium

Je nach Zellzahl erhält man bei der Messung der Glukoseabnahme im Medium (Abb. 32) einen linearen oder einen steileren Abfall, der einer e-Funktion entspricht (Hein, 1971). Äscinzusatz verursacht eine weniger steile Abnahme, d. h. es wird weniger Glukose in die Zelle aufgenommen und weniger verbraucht. Diese Hemmung tritt nach ca. 5 min ein.

b. $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung aus $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glukose

Die Bildung von $^{14}\text{CO}_2$ aus $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glukose, die wie erwähnt vorwiegend über den Pentosephosphatweg erfolgt ist, wie erwartet, absolut gering, jedoch gut meßbar (Abb. 33). Der Hemmeffekt von Äscin setzt sofort ein. Kleine Äscinkonzentrationen können die CO_2 -Bildung nicht stimulieren.

5. Atmungsmessung nach Warburg

Bei der Atmungsmessung von Y.A.T.Z. mit dem Warburggerät läßt sich bei Zusatz von Äscin ($3 \times 10^{-5}\text{M}$) ein verminderter O_2 -Verbrauch feststellen (Abb. 34). Die Hemmung der Atmung tritt gegenüber der Hemmung des Glukoseverbrauchs verzögert ein, und zwar nach 15 min. Kleinere Konzentrationen ($1 \times 10^{-5}\text{M}$, $3 \times 10^{-6}\text{M}$) hemmen wie erwartet innerhalb der Meßzeit die Atmung nicht (Abb. 34).

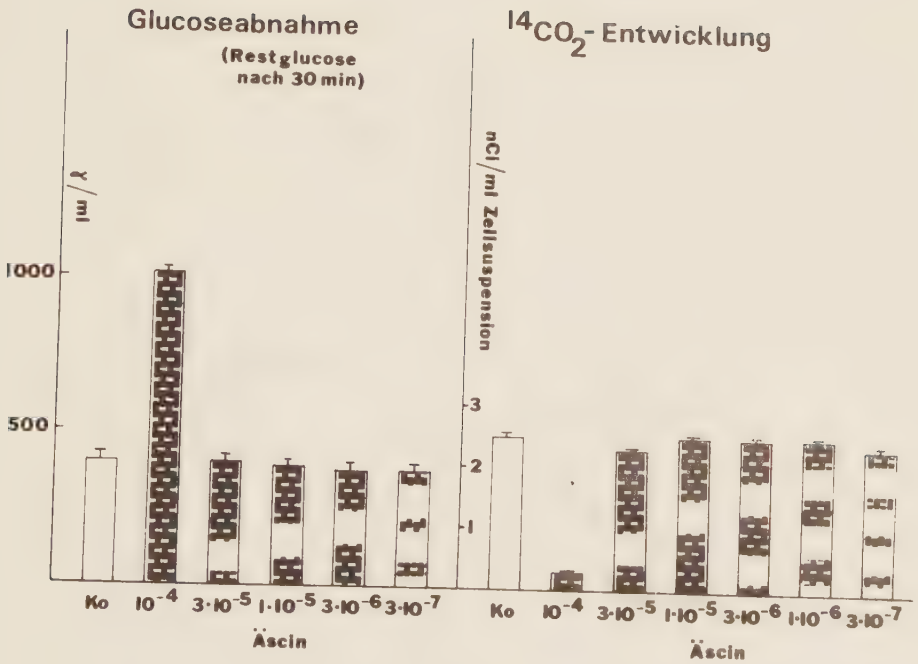


Abb.32: Einfluß der Äscinkonzentration auf den Glukose-verbrauch von Yoshidazellen

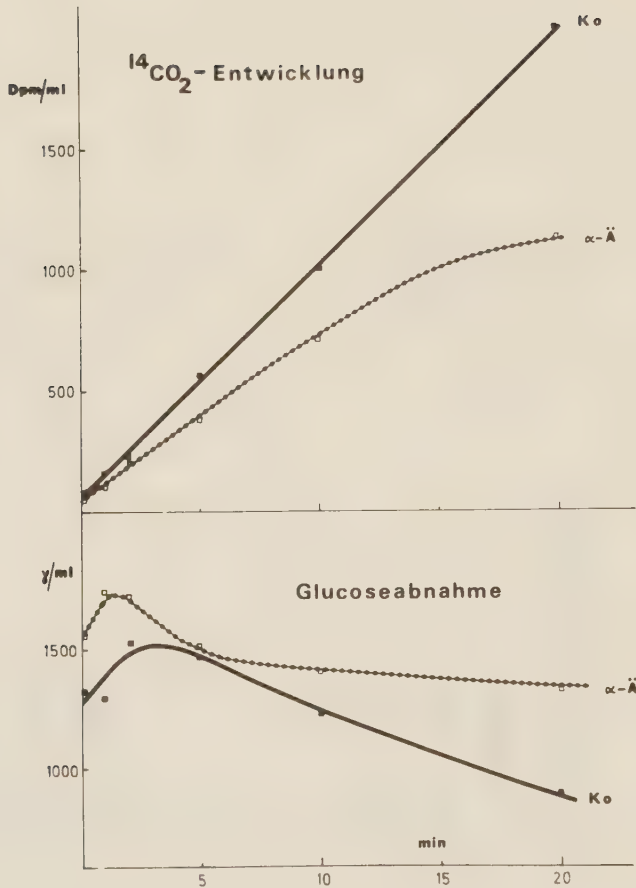


Abb. 33: Hemmung der Glukoseabnahme und der CO_2 -Bildung durch Ascini ($3 \times 10^{-5}\text{M}$) während der Inkubation von Y.A.-.Z.

Messung der Atmung von Y.A.T.Z.

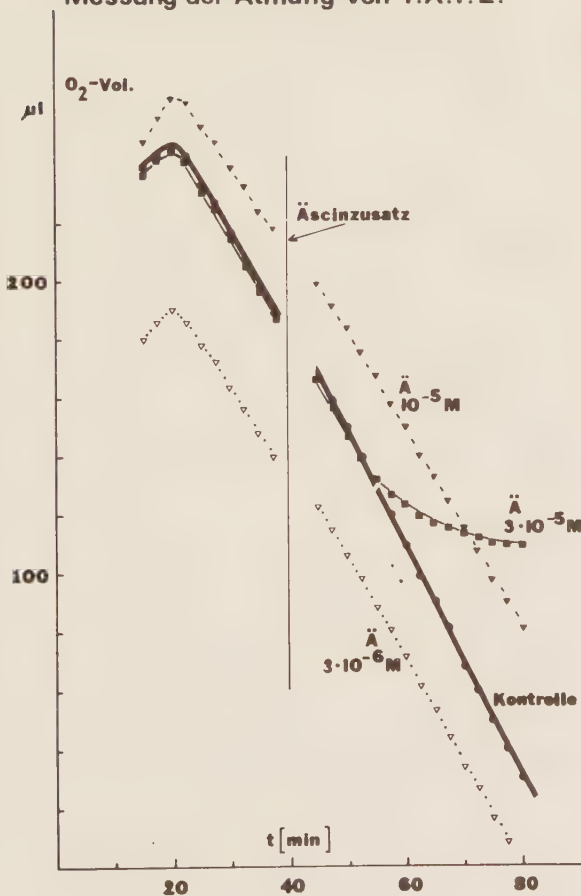


Abb. 34: Einfluß von Äscin auf den Sauerstoffverbrauch von Yoshidazellen.

6. Ionenflüsse durch die Zellmembran von Y.A.T.Z.

Der Ionentransfer durch die Plasmamembran wurde als Funktion der Zusammensetzung des Mediums, der Art der Vorbehandlung der Zellen und des Einwirkens unterschiedlicher Reagenzien untersucht. Gleichzeitig wurde die Glukoseabnahme als Maß für die Funktionsfähigkeit der Zellen unter den jeweiligen Bedingungen beobachtet.

a. Variation in der Zusammensetzung des Mediums:

Inkubation im Ringerphosphatmedium

Während der Inkubation von Y.A.T.Z. bei 37°C im H₂O-Bad bleibt der Gehalt an Na⁺ und K⁺ im Medium innerhalb einer geringen Schwankungsbreite konstant. Der Zusatz der oberflächenaktiven Substanz Äscin ändert dieses dynamische Gleichgewicht (Abb. 35). Unmittelbar nach Äscinzusatz erfolgt ein schneller massiver Nettoefflux von K⁺ in das Medium, der nach 6 - 8 min zum Erliegen kommt. Demgegenüber ändert sich der Gehalt von Na⁺ nicht merklich. Ferner nimmt im Medium die Glukosekonzentration linear ab. Die Hemmung durch Äscin ($3 \times 10^{-5} \text{M}$) setzt bei diesem Vorgang 6 - 8 min nach Äscinzusatz ein.

Der Ersatz von K⁺ durch Na⁺ im Medium führt zu einem geringen, in dieser Versuchsanordnung unmeßbar schnellen Austritt von K⁺ in das Medium. Während der weiteren Inkubation bleibt der K⁺-Gehalt aber unverändert. Der Na⁺-Gehalt steigt geringfügig an. Der Zusatz von Äscin löst wie im unveränderten Ringerphosphatmedium einen Nettoefflux von K⁺ aus, der nach 6 - 8 min scheinbar wieder zum Stillstand kommt, d. h. zu einem neuen Gleichgewichtszustand führt. Der Glukoseverbrauch gleicht demjenigen in unverändertem Ringerphosphatmedium.

Inkubation in physiologischer Kochsalzlösung

Die Verwendung von physiologischer Kochsalzlösung statt Ringerphosphatmedium führt zu folgenden Konzentrationsveränderungen der Alkaliionen (Abb.36). Der Nettoausstrom von K^+ ist mit und ohne Äscin sehr gering, beginnt aber bei Äscingabe von einem geringfügig höheren Ausgangswert. Außerdem läßt sich ein geringer Äscin-unabhängiger Na^+ -Efflux feststellen. Der Glukoseverbrauch ist eingeschränkt.

Inkubation in isotoner Saccharoselösung

Als ionenarmes Medium diente zunächst eine etwa 10,5 % isotone Saccharoselösung (Abb.37). Durch Inkubation in Saccharose erhöht sich die Na^+ - und K^+ -Konzentration im Medium. Äscin verursacht eine nur geringfügige Änderung der K^+ -Konzentration. Der Na^+ -Gehalt des Mediums steigt dagegen nach Äscingabe sprunghaft auf einen ca. 20 % höheren Wert an, der sich aber dann während der gesamten Inkubationszeit nur minimal erhöht.

Inkubation in isotoner Mannitlösung

Als weiteres ionenarmes Medium, das im Gegensatz zur Saccharoselösung eine einfache Glukosebestimmung mittels des GOD-Testsatzes zuließ, bot sich eine isotone Mannitlösung (pH 7,3) an (Abb.38). Während der Inkubation stieg der Na^+ -Gehalt im Medium unabhängig von der Äscingabe nur wenig an. Der K^+ -Ausstrom ins Medium erhöhte sich nach Äscinzusatz. Im Bereich von 6 - 8 min durchläuft die K^+ -Effluxkurve einen Wendepunkt. Im Medium ließ sich eine verminderte Abnahme der Glukosekonzentration feststellen.

Eine Anreicherung der Mannitlösung mit je 10 mM Na^+ , K^+ und Ca^{++} führte zu ähnlichen Ergebnissen wie beim Ringerphosphatmedium (Abb. 39). Da die willkürliche Zusammensetzung des Mediums (je 10 mM Na^+ , K^+ , Ca^{++}) keinem Gleichgewichtszustand entspricht, stieg der Na^+ -Gehalt unabhängig von Äscin langsam mit der Inkubationsdauer an. Die K^+ -Konzentration jedoch blieb während der

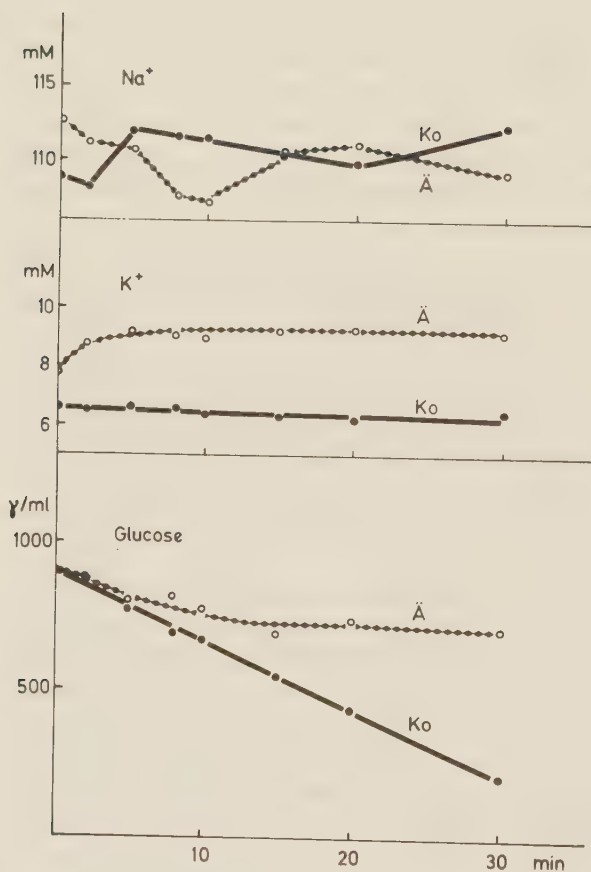


Abb.35: Wirkung von Äscin auf den K⁺-, Na⁺- und Glukosegehalt im Ringerphosphatmedium während der Inkubation von Y.A.T.Z.

Inkubation von Y.A.T.Z. im physiol. NaCl-Medium

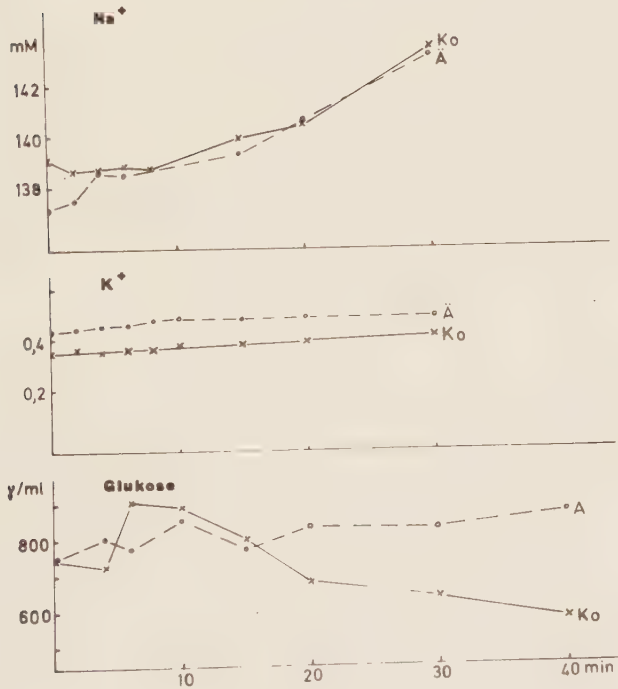


Abb.36: Einfluß von Äscin auf den Gehalt an K⁺, Na⁺ und Glukose im physiologischen NaCl-Medium

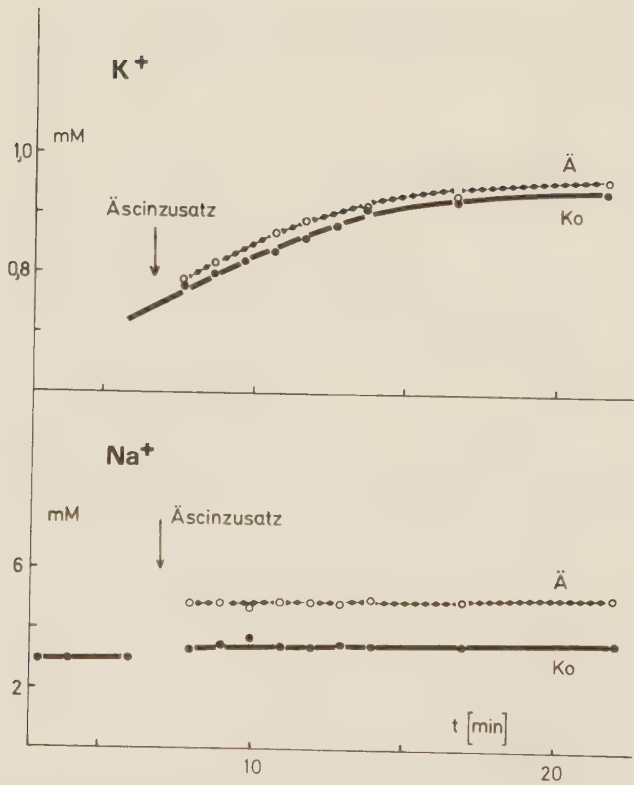


Abb.37: Wirkung von Äscin auf den K^+ - und Na^+ -Gehalt in isotoner Saccharoselösung

Inkubation von Y.A.T.Z. im Mannitmedium

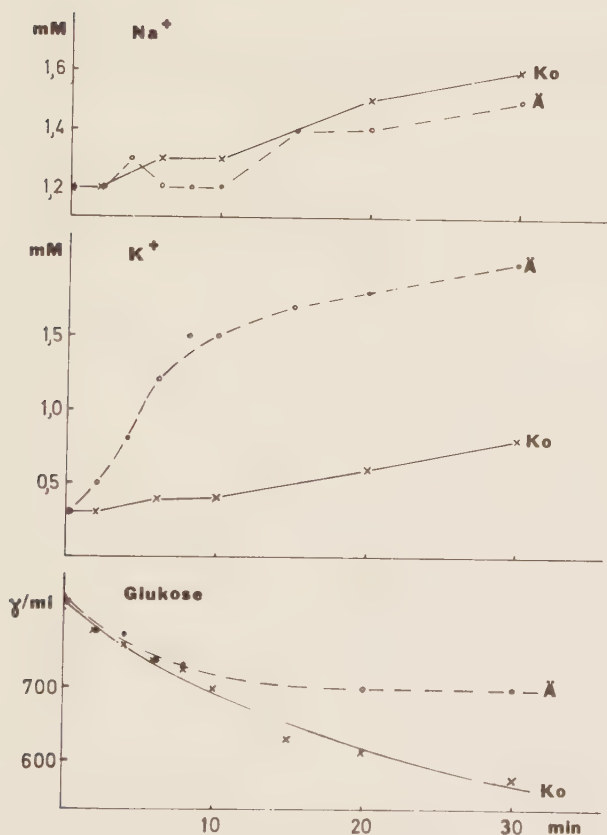


Abb.38: Das Inkubationsmedium bestand aus einer isotonen Mannitlösung ohne Ionenzusätze.
Die verwendete Äscinkonzentration betrug $3 \times 10^{-5} \text{M}$.

EINFLUSS VON AESCIN AUF DEN GLUKOSETRANSPORT UND
DIE IONENBEWEGUNGEN VON Na^+ , K^+ UND Ca^{++}

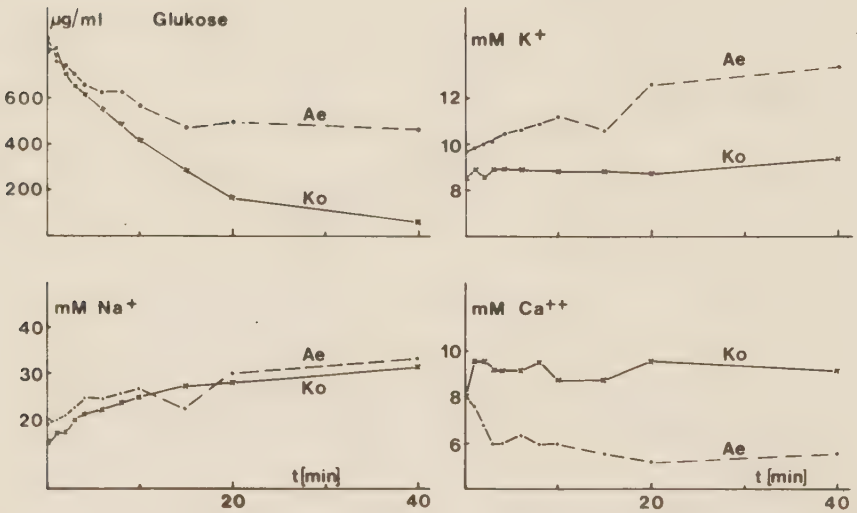


Abb.39: Einfluß von Äscin auf den Na^+ -, K^+ - und Ca^{++} -Gehalt im Mannitmedium, das je 10 mM Na^+ , K^+ und Ca^{++} enthielt.

Inkubationsdauer unverändert. Der Zusatz von Äscin löste wiederum einen erhöhten K^+ -Ausstrom aus. Der Endwert wird offenbar gegenüber der Situation im Ringerphosphatmedium zu einem etwas späteren Zeitpunkt erreicht. Der Ca^{++} -Gehalt des Mannitmediums veränderte sich während der Inkubation unter Kontrollbedingungen nicht. Äscin dagegen verursachte im Medium eine starke Ca^{++} -Abnahme, vor allem während der ersten 5 - 10 Minuten. Der Glukoseverbrauch glich jenem im Ringerphosphatmedium und wurde auch hier wiederum ca. 6 min nach Äscinzusatz eingeschränkt.

Eine Variation des Salzgehaltes des Mannitmediums, und zwar eine Erhöhung des Na^+ -Gehaltes auf 20 mM, während die Konzentration von K^+ und Ca^{++} mit je 10 mM. beibehalten wurde, hatte einen interessanten Befund zur Folge. Bei diesen extrazellulären Konzentrationsverhältnissen strömt K^+ während einer 30min-Inkubation in die Zelle (Abb. 40). Der Zusatz von Äscin hemmt den Eintrom, es kommt zur Umkehrung des K^+ -Stroms. Bei 6 - 8 min liegt der Wendepunkt. Die Zellen verbrauchen ohne merkliche Einschränkung Glukose.

b. Behandlung der Zellen mit verschiedenen Hyurolasen

Während einer 30min-Einwirkung von Neuraminidase und Phospholipase D auf Y.A.T.Z. erhöhte sich der Eiflux von K^+ gegenüber Kontrollwerten. Nach Auswaschen der Enzyme aber änderte sich in einer erneuten Inkubation der K^+ -Flux gegenüber unbehandelten Zellen nicht (Abb. 41). Die Glukoseabnahme im Medium verlief bei behandelten Zellen während der 45min-Inkubationszeit um ca. 10 - 15 % steiler. Äscin ($3 \times 10^{-5}M$) hemmte in der gleichen Weise wie bei den Kontrollwerten. Der Vitalitätsnachweis mit Trypanblau am Ende der Hauptinkubation erbrachte für unbehandelte und Neuraminidase-behandelte Zellen ca. 20 % tote Zellen, während dieser Anteil bei Phospholipase-behandelten Zellen sich auf ca. 30 % belief.

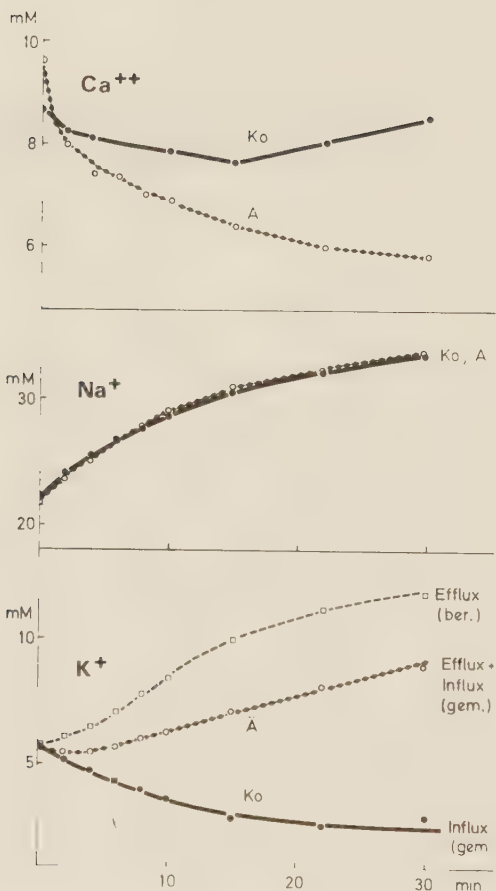


Abb.40: Wirkung von Äscin auf die Konzentration von Na⁺, K⁺ und Ca⁺⁺ im Mannitmedium, das 20 mM Na⁺, 10 mM K⁺ und 10 mM Ca⁺⁺ enthielt.

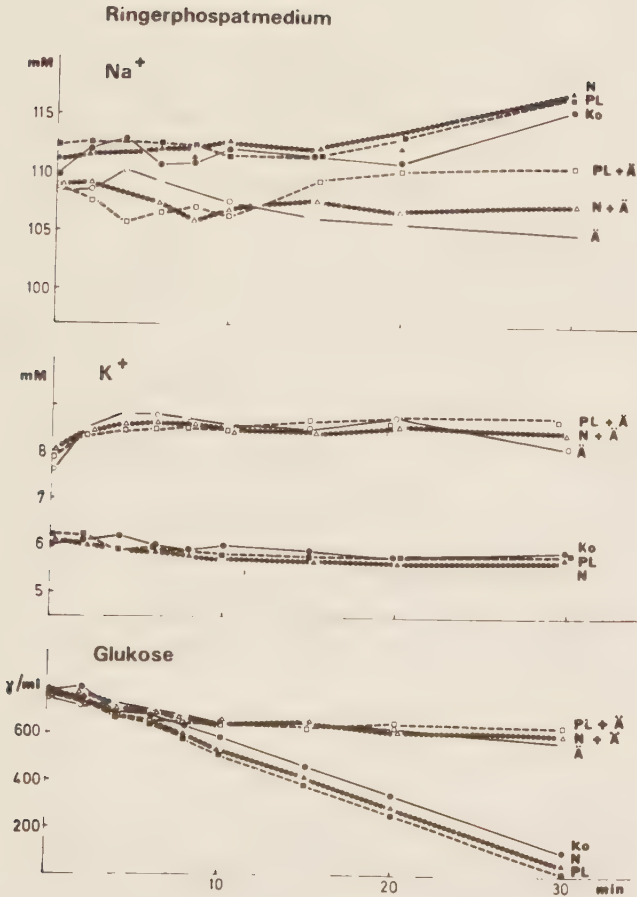


Abb.41: Die Wirkung von Äscin auf den Na⁺-, K⁺- und Glukosegehalt von Y.A.T.Z. im Ringerphosphatmedium. Die Zellen waren mit Phospholipase D 30 min bei pH 5,7 und mit Neuraminidase 30 min bei pH 7,3 vorbehandelt.

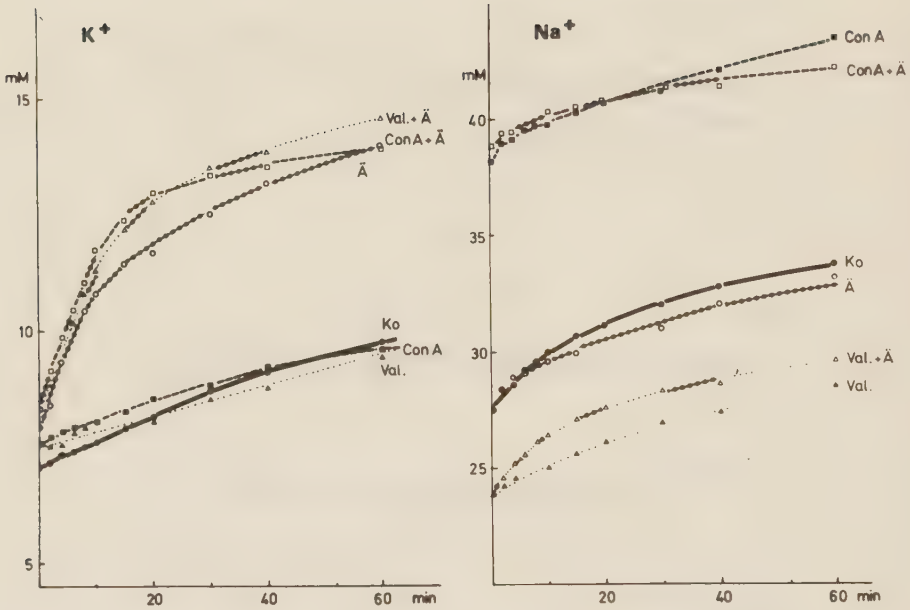


Abb.42a: Einfluß von Concanavalin A und Valinomycin auf den K^+ - und Na^+ -Transport in Yoshida-Ascites-tumorzellen in einem Mannitmedium (10 mM K^+ , 20 mM Na^+). Äscin wurde in einer Konzentration von $3 \times 10^{-5} M$ zugesetzt.

EINFLUSS VON CONCAVALIN A UND VALINOMYCIN
AUF DEN GLUKOSE- UND Ca^{++} -TRANSPORT.

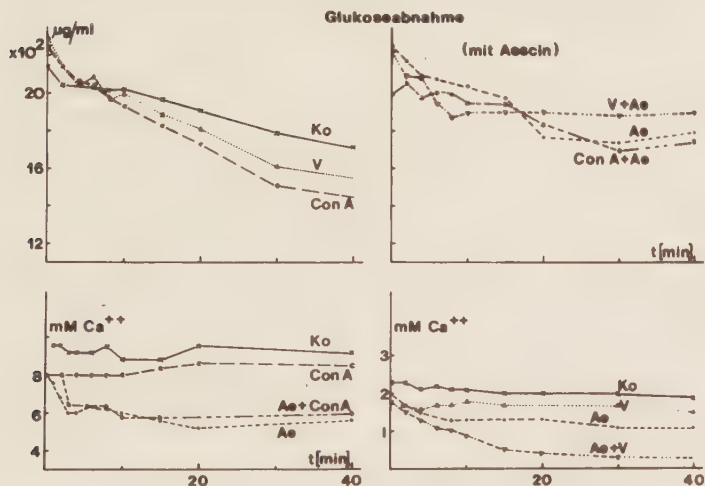


Abb. 42b: Die Messung des Glukose- und Ca^{++} -Transports erfolgte in einem Mannitmedium.
In dem Ansatz mit Con A betrug der Ca^{++} -Gehalt 10 mM, in dem Ansatz mit Valinomycin 2,5 mM.
Äscin wurde in einer Konzentration von $3 \times 10^{-5} M$ zugesetzt.

c. Mediumzusätze:

trypsiniertes Concanavalin A

Bei der Mehrzahl der Ergebnisse war es ohne Belang, ob die Zellen 20 min mit trypsinierten Con A (ca. 55 μ /ml) vorinkubiert wurden oder ob erst zu Beginn der Hauptinkubation Con A zugesetzt wurde. Während sich der K^+ -Gehalt des Mediums nach Con A-Zusatz gegenüber Kontrollwerten nicht unterschied, war die Na^+ -Konzentration im Vergleich zu Kontroll- und Äscinwerten beträchtlich erhöht (Abb. 42a). Der Na^+ -Ausstrom erfolgte sprunghaft und unmeßbar schnell nach dem Zusatz von Con A und änderte sich dann im weiteren Verlauf der Inkubation nur noch geringfügig. Auf die Ca^{++} -Konzentration des Mediums wirkte sich der Zusatz von Con A erniedrigend aus (Abb. 42b). Ähnlich dem Na^+ -Nettoefflux erhöhte sich auch die Ca^{++} -Abnahme nach der Reagenzzugabe sprunghaft und blieb dann nahezu unverändert. Der gleichzeitige Äscinzusatz erhöhte in einigen Fällen zusätzlich die Ca^{++} -Abnahme im Medium.

Der Glukoseverbrauch wurde durch Con A-Zusatz merklich (ca. 30 - 40 %) gesteigert. Aber auch hier trat die Äscinhemmung nach ca. 6 min ein.

Valinomycin

Der "Ionencarrier" Valinomycin verringerte die Na^+ - und Ca^{++} -Konzentration des Mannitmediums gegenüber Kontrollwerten (Abb. 42a, 42b). Bei Na^+ erfolgte die Änderung in einem Sprung unmittelbar nach Reagenzzugabe. Der K^+ -Gehalt änderte sich nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von Äscin. Valinomycin scheint jedoch, ohne bei diesen Versuchsbedingungen selbst wirksam zu sein, den K^+ -steigernden Nettoefflux von Äscin noch weiter zu verstärken. Der Zusatz von Äscin zeigte keinen Einfluß auf den Na^+ -Transport, dagegen verringerte sich der Ca^{++} -Gehalt des Mediums während der Inkubation zusätzlich um ca. 25 %. Bei der Ca^{++} -Abnahme im Medium scheinen Äscin und Valinomycin eine synergistische Wirkung auszuüben.

**HEMMWIRKUNG VON AESCIN AUF DEN α -AMINOISOBUTTERSÄURE-
TRANSPORT IN YOSHIDA-ASCITES-TUMORZELLEN.
EINFLUSS DER Ca^{++} -KONZENTRATION DES AUSSEN-MEDIUMS.**

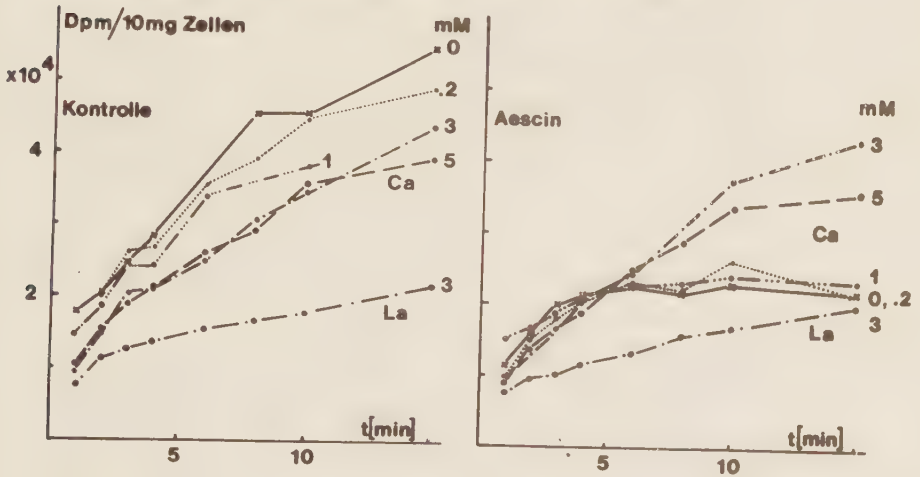


Abb.43: Die verwendete Äscinkonzentration betrug $3 \times 10^{-5} M$.

d. Variation der Ca^{++} -Konzentration im Medium:

Die Verwendung unterschiedlich zusammengesetzter Medien hat gezeigt, daß einerseits in einem Saccharose- bzw. Mannitmedium ohne Metallionenzusätze der Glukosetransport in Y.A.T.Z. unterbleibt oder beträchtlich eingeschränkt ist, andererseits der Ersatz von K^+ durch Na^+ im Ringerphosphatmedium jedoch keine nachteiligen Folgen auf den Glukosetransport hat. Aus den vorher beschriebenen Befunden ist ersichtlich, daß Ca^{++} neben K^+ dasjenige Kation ist, dessen Gehalt im Mannitmedium durch Äscin während der Inkubation wesentlich verändert wird. Deshalb soll die Variation des Ca^{++} -Gehaltes des Mediums zeigen, ob die Hemmwirkung von Äscin auf den Transport von Zuckern und Aminosäuren in einem Zusammenhang mit der Ca^{++} -Konzentration des Mediums steht.

In Abb. 43 ist der Transport der nicht verstoffwechselbaren Aminosäure α -AIB in Abhängigkeit vom Ca^{++} -Gehalt des Mediums dargestellt.

Die Aminosäureaufnahme ist der extrazellulären Ca^{++} -Konzentration des Mediums umgekehrt proportional. So führt eine ansteigende Ca^{++} -Konzentration des Mediums zur Abnahme des Aminosäuretransports in die Zelle.

Eine Ca^{++} -Konzentration von etwa 3 - 5 mM zeigt bereits deutliche Hemmwirkung. Aber auch eine Behandlung der Zellen 15 min mit 5 mM EDTA, wodurch der zelluläre Ca^{++} -Gehalt (Membran-gebunden oder intrazellulär) beträchtlich verringert wird, führt in der nachfolgenden Inkubation in Ca^{++} -freiem Medium zu einer starken Hemmung (ca. 50 %) der Aufnahmefähigkeit für α -AIB.

Die Gegenwart von Äscin ($3 \times 10^{-5}\text{M}$) verursacht bei einer extrazellulären Ca^{++} -Konzentration bis 3 mM und über 10 mM den bekannten Hemmeffekt. Im Bereich von 3 - 5 mM zeigt sich dagegen eine sichtbare Verringerung der Äscin-hemmung. In günstigen Fällen (Mannitmedium 10 mM Na^+ , K^+ , Ca^{++}) konnte die Äscin-hemmung beinahe völlig aufgehoben werden.

Dieser Befund zeigt, daß die Konzentration des zellulären Ca^{++} (Membran-gebunden bzw. intrazellulär), die durch Äscin erhöht werden kann, einen deutlichen Einfluß auf das Transportgeschehen besitzt.

Ersetzt man das 2-wertige Ca^{++} durch das 3-wertige La^{+++} (Abb. 43), zeigt sich bereits nach wenigen Minuten eine starke Hemmung der α -AIB-Aufnahme in die Zelle. Möglicherweise erfolgt eine starke Bindung des 3-wertigen Kations an negative Oberflächenladungen, was zu einer Blockierung der Rezeptorenstellen für Aminosäuren und Glukose führt oder eine Konformationsänderung der Membranoberfläche nach sich zieht.

7. Leitfähigkeitsmessungen

Auf Grund der geringen Ionenstärke des Mediums (14 ml Saccharose, 1 ml Zellsuspension in Ringerphosphatmedium) strömten in der Inkubationszeit fortwährend Ionen aus den Zellen (Abb. 44). Die Leitfähigkeit steigt an, mit zunehmender Inkubationsdauer aber weniger steil.

Nach Zusatz von Äscin ändert sich die Ionenstärke und damit die Leitfähigkeit beträchtlich. Es kommt zunächst zu einem steilen Anstieg, der dann im weiteren Verlauf wieder abflacht. Die Leitfähigkeitskurve durchläuft einen Wendepunkt. Die Zeit, nach der dieser Punkt erreicht ist, hängt von der Äscinkonzentration und der Zellzahl ab.

Analoge Messungen der K^+ -Konzentration mittels eines Flammenphotometers haben ebenfalls einen Kurvenverlauf mit Wendepunkt ergeben, der zeitgleich mit jenem der Leitfähigkeitskurve auftritt und möglicherweise für dessen Erscheinen verantwortlich ist.

8. Die Anlagerung von Äscin an die Membran von Y.A.T.Z.

Bei der Anlagerung von Äscin an Y.A.T.Z. im H_2O -Bad bei 37°C kam es innerhalb von wenigen (2 - 5) Minuten zur Sättigung, wie sich an Hand von ^3H -Äscin feststellen

ließ (Abb. 45).

Wird die Suspension der ^3H -markierten, in NaOH gelösten Zellen kurzzeitig erhitzt oder mit HClO_4 bis zu stark saurem pH versetzt, so erhält man im auftretenden Niederschlag nur wenig, im Überstand dagegen die Hauptmenge der Radioaktivität (Abb. 45). Daraus könnte man annehmen, daß die Äscinbindung an die Zellen gelöst wurde. Selbst wenn dies der Fall wäre, kann man aber wegen der angewandten robusten Behandlungsmethoden nicht unbedingt auf eine nur lose Äscinbindung an die Zelloberfläche schließen.

Gleichzeitig mit der Freisetzung von gebundenem ^3H -Äscin wurde auch Material von der Zellmembran losgelöst (Abb. 53), das im Inkubationsmedium mit HClO_4 gefällt und dessen Gehalt an Radioaktivität und Proteingehalt über die Zeit nahezu konstant ist, nimmt die Radioaktivität ab.

Die Versuche über die Freisetzung von ^3H -Äscin, das während unterschiedlich langer Zeiten in einer Vorinkubation angelagert war, offenbarten einen beträchtlichen Verlust der Radioaktivität allein durch das Waschen der Zellen nach der Vorinkubation. In der Nachinkubation wurde bei Zellen, die nur einmal gewaschen waren, während der ersten Minuten ^3H -markiertes Material freigesetzt (Abb. 46). Bei 3 x gewaschenen Zellen änderte sich die an die Oberfläche gebundene Radioaktivität nicht mehr.

9. Titration von Y.A.L.Z.

Der Kurvenverlauf einer Titration von Kontroll- und Äscin-behandelten (3, 7, 15 min) Zellen ist in Abb. 47 dargestellt. Daraus lassen sich 2 Aussagen ableiten:

- a. Der Umschlagspunkt, der Wendepunkt der Kurve, scheint bei Äscin-behandelten Zellen gegenüber Kontrollen nicht verändert zu sein.
- b. Bei Äscin-behandelten Zellen ist eine größere Menge an Titrationsflüssigkeit (HCl bzw. NaOH) nötig,

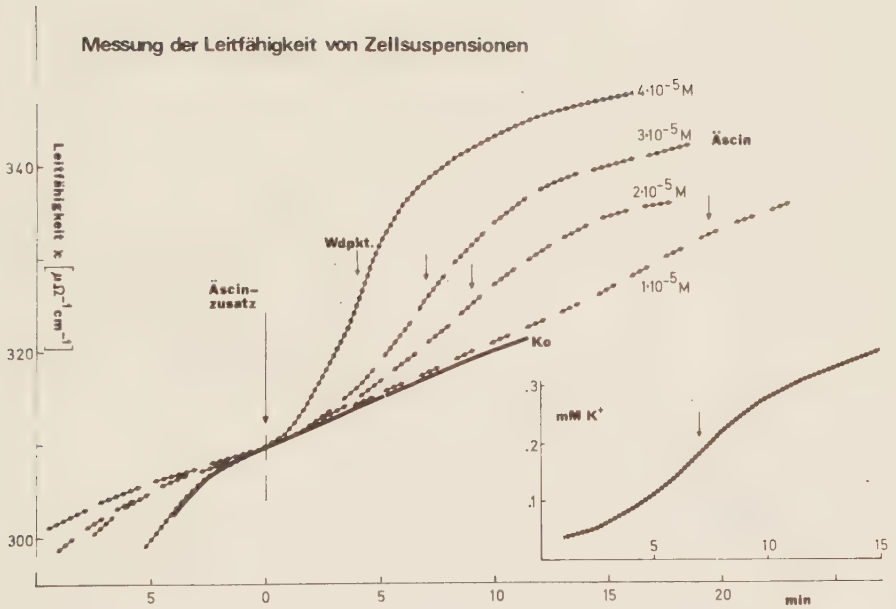


Abb. 44: Einfluß von Äscin auf die Leitfähigkeit von Y.A.T.Z. Die Zahl der Zellen in einer Meßprobe (15 ml) betrug $(100 - 150) \times 10^6$. Der Einschub (rechts) zeigt die parallel verlaufende Änderung der K^+ -Konzentration im Medium nach Äscinzusatz ($3 \times 10^{-5} \text{ M}$).

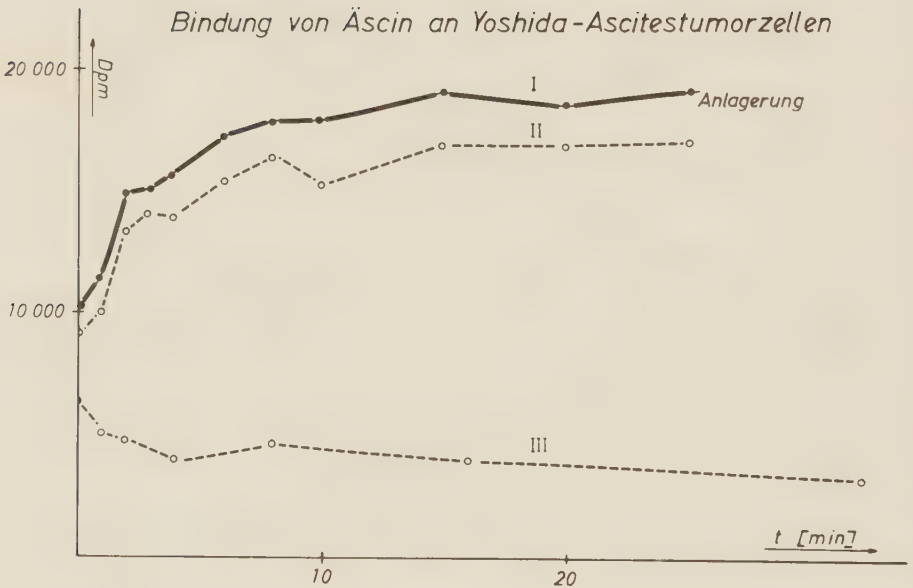


Abb.45: I. Anlagerung von ^3H -markiertem Äscin
II. ^3H -Radioaktivität im Überstand nach
Lösen der Zellen in NaOH und Fällung
durch HClO_4
III. ^3H -Radioaktivität im Niederschlag

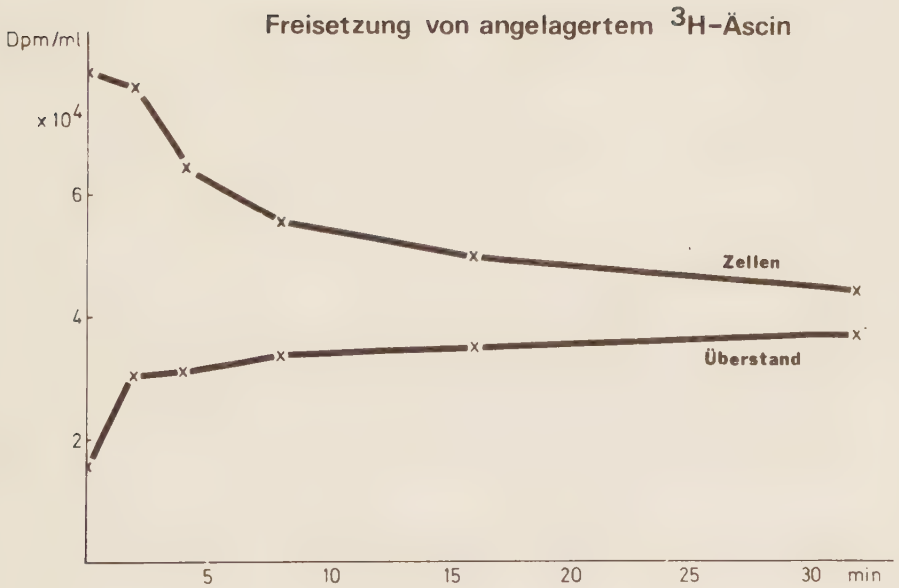


Abb.46: Abgabe von ^3H -Äscin während einer 30min Inkubation nach vorheriger 15min Anlage-
rung. Die Zellen wurden zwischen den
beiden Inkubationen 3 x gewaschen.

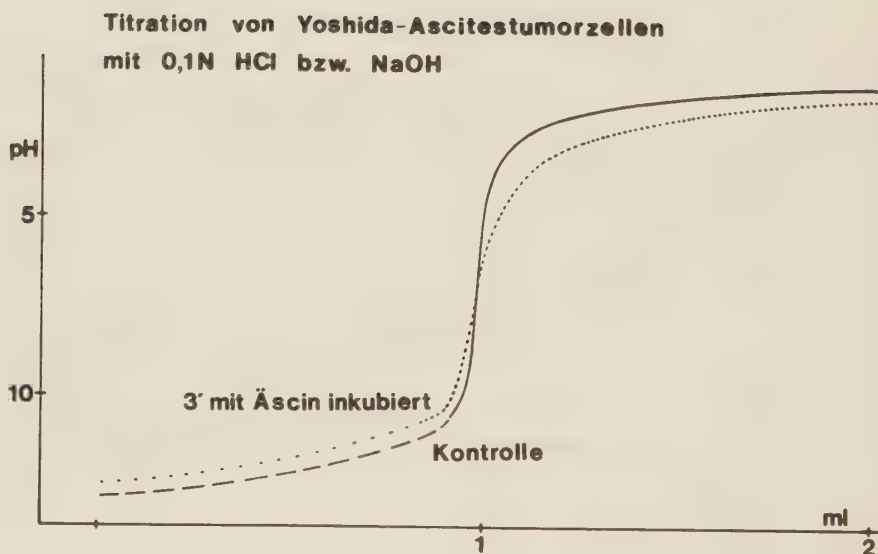


Abb. 47: Die Zahl der Zellen in einem Ansatz (6 ml 0,9 % NaCl-Lösung pH 7,0) betrug $(200-250) \times 10^6$. Die Konzentration von Äscin während der 3min-Vorbehandlung betrug $3 \times 10^{-5} M$.

Isoelektr. Fokussierung von Yoshida-Ascitestumorzellen

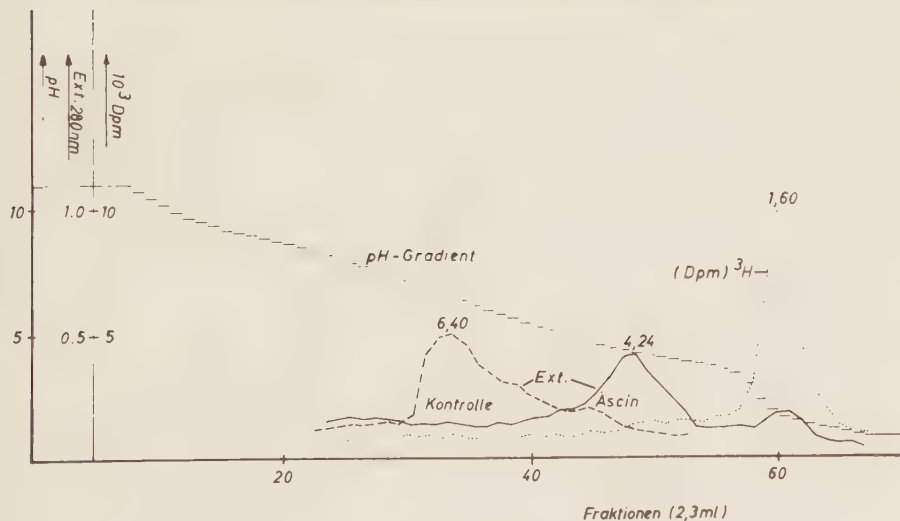


Abb. 48: Zellen, die unter Kontrollbedingungen inkubiert waren, sammelten sich bei der isoelektrischen Fokussierung bei einem pH-Wert von ca. 6,40; Zellen, die mit Äscin ($3 \times 10^{-5}M$) behandelt waren, wurden bei einem pH-Wert von 4,24 gefunden. Die ³H-Aktivität bei dem pH-Wert von ca. 1,60 stammt von dem zugesetzten ³H-Äscin her.

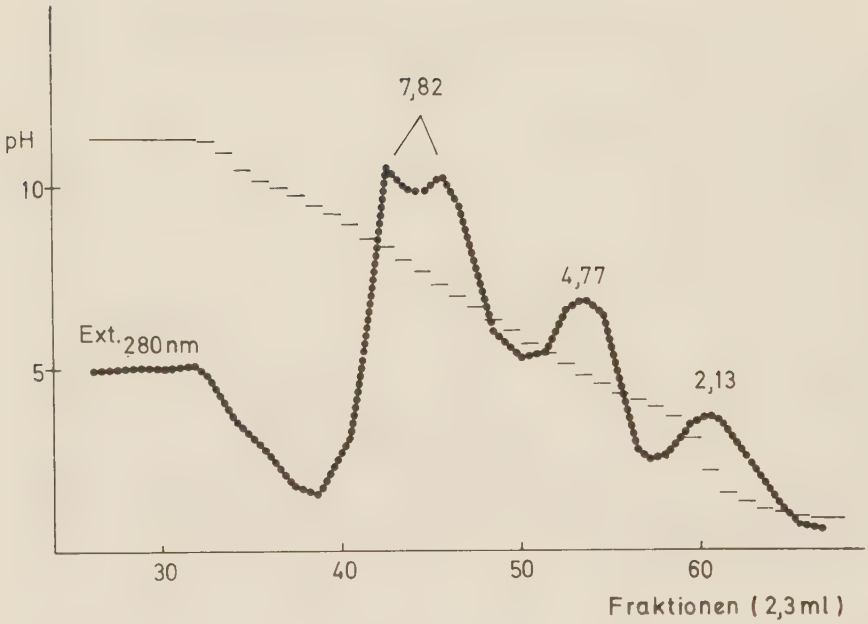


Abb.49: Isoelektrische Fokussierung von Y.A.T.Z., die 15 min mit Neuraminidase (1 mg/ml Zellsuspension) vorbehandelt waren.

um denselben pH-Wert wie bei den Kontrollwerten zu erreichen.

10. Isoelektrische Fokussierung von Y.A.T.Z.

Y.A.T.Z. zeigten nach 7 min Behandlung mit Äscin eine auffallende Veränderung ihrer Lage im pH-Gradienten (Abb. 48). Sie wanderten in einen viel stärker sauren Bereich als Kontrollzellen. Bei der Auszählung der 7 min Äscin-behandelten Y.A.T.Z. wurden nur tote Zellen gefunden, obwohl sich unter dem Lichtmikroskop vor der Elektrofokussierung keine Einschränkung ihrer Lebensfähigkeit feststellen ließ. Im stark sauren Bereich (pH-Wert ca. 1,6) wurde die ^3H -Aktivität des Äscins gefunden.

Die Fokussierung von unbehandelten Kontrollzellen bestätigte den von Sherbet et al. (1970) erhaltenen pI-Wert von ca. 6,4. Die Anzahl der toten Zellen im Hauptgipfel belief sich aber auf einen wesentlich höheren Wert von ca. 70 % gegenüber von ca. 20 %.

Eine Aufspaltung der Zellen im pH-Gradienten mindestens 3 Gruppen lieferte die isoelektrische Fokussierung von Y.A.T.Z., die 15 min mit Neuraminidase behandelt waren (Abb. 49). Der Gipfel in einem mehr alkalischen Bereich (pI = 7,82) entspricht wegen der Sialinsäureabspaltung der Erwartung.

11. Fluorometrische Bestimmung von Zellmaterial

a. Fluorometrische Messung mit ANS

Ohne vorheriges 5 x Waschen der Y.A.T.Z. mit Ringerphosphatmedium verursachte die den Zellen anhaftende Ascitesflüssigkeit einen derartig hohen Fluoreszenzpegel, daß man während der Inkubationsdauer keinerlei Änderung der Fluoreszenzintensität wahrnehmen konnte (Abb. 50).

Bei der Fluoreszenzmessung von Medienproben, in denen

5 x gewaschene Zellen inkubiert waren, führt die fortschreitende Inkubationsdauer zu einem Anstieg der Transmission (Abb. 51). Die Maxima der jeweiligen Emissionspeaks wurden in ein Diagramm (Transmission als Funktion der Inkubationsdauer) übertragen. Äscin führt zu einer starken Erhöhung der Fluoreszenzwerte (Abb. 51). Nach ca. 15 min hat die Fluoreszenzintensität ein Plateau erreicht.

ANS dient, wie bereits besprochen, als empfindlicher Indikator für Ionenbindungen in Proteinen und Lipiden (Gomperts et al., 1970). Dementsprechend sollte der durch Äscin hervorgerufene Fluoreszenzanstieg im Zellüberstand auf eine der beiden Gruppen zurückzuführen sein. Kurzzeitiges Erhitzen oder HClO_4 -Zusatz bewirkten im Inkubationsüberstand eine Fällung. Nach Abzentrifugieren dieses Niederschlags ging die Fluoreszenzintensität im Medium auf ein Minimum zurück. Somit ist es wahrscheinlich, daß Teile des abgelösten Materials Proteincharakter besitzen, zumal die Bestimmung des Lipidgehaltes im Überstand (Boehringer Testsatz) negativ verlief.

b. Messung der natürlichen Eigenfluoreszenz von Membranbestandteilen

In Abb. 52 ist für das Inkubationsmedium die Eigenfluoreszenz, die Fluoreszenz mit ANS und die Absorption bei 280 nm dargestellt. Während die Fluoreszenzintensität vor allem der Äscinproben bei der Messung mit ANS mit zunehmender Inkubationsdauer ansteigt, vermindert sich umgekehrt die Größe der natürlichen Eigenfluoreszenz. Dieser Befund dürfte sich mit den ansteigenden Absorptionsvermögen des Inkubationsmediums erklären.

12. Gravimetrische Ermittlung des abgelösten Zellmaterials

Das Gewicht der gefriergetrockneten Gesamtüberstände in

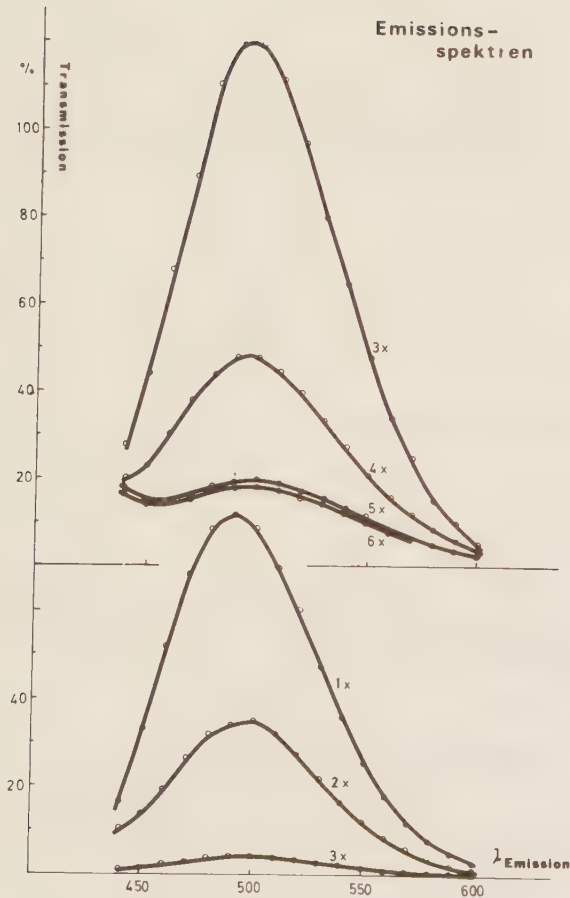


Abb.50: Fluoreszenzvermögen von Yoshidaascites-
zellsuspensionen nach 1x, 2x, 3x, 4x und
5x Waschen mit Ringerphosphatmedium

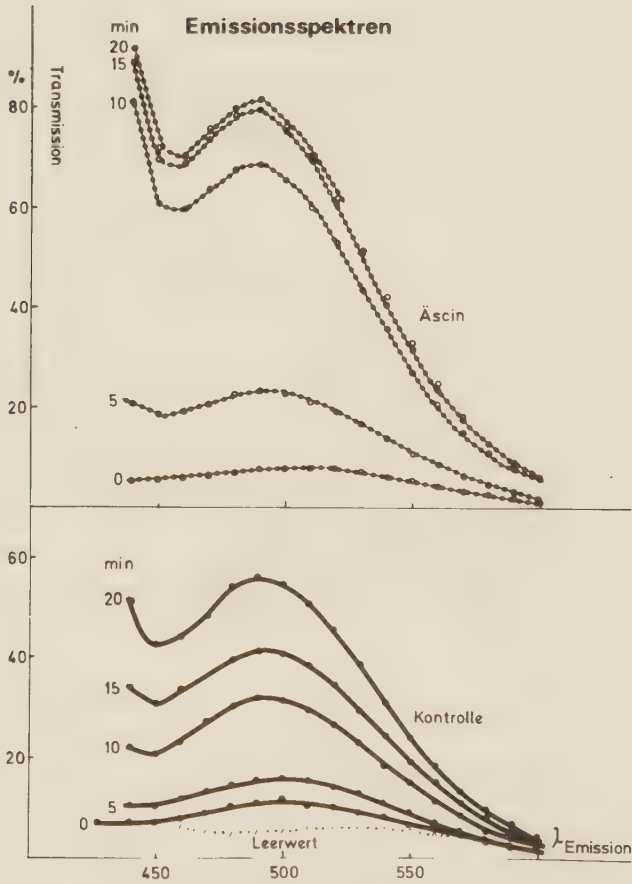


Abb.51: Anstieg des Fluoreszenzvermögens mit fortschreitender Inkubationsdauer

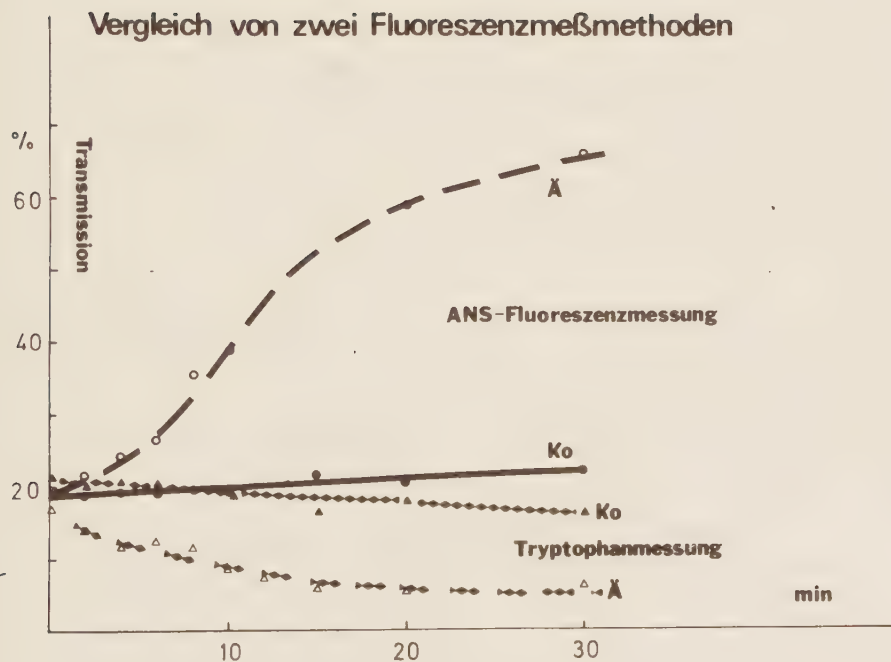


Abb.52: Vergleich zwischen der natürlichen Eigenfluoreszenz- und der ANS-Fluoreszenzmethode.

Das Absorptionsvermögen entsprach etwa dem Verlauf der Äscinkurve bei der ANS-Fluorometrie

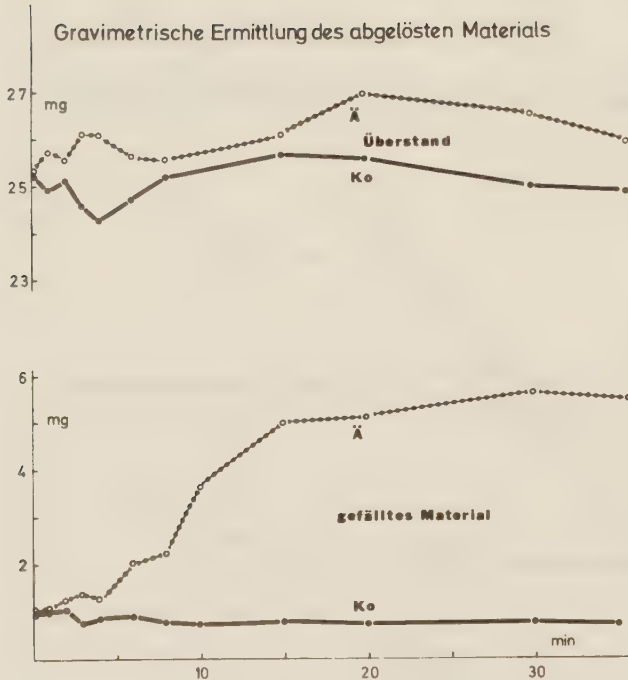


Abb. 53: Zeitverlauf der Abgabe von Zellmaterial aus Yoshida-Ascitestumorzellen. Die Inkubation der Zellen erfolgte im Ringerphosphatmedium. Die Äscinkonzentration betrug $3 \times 10^{-5} \text{ M}$.

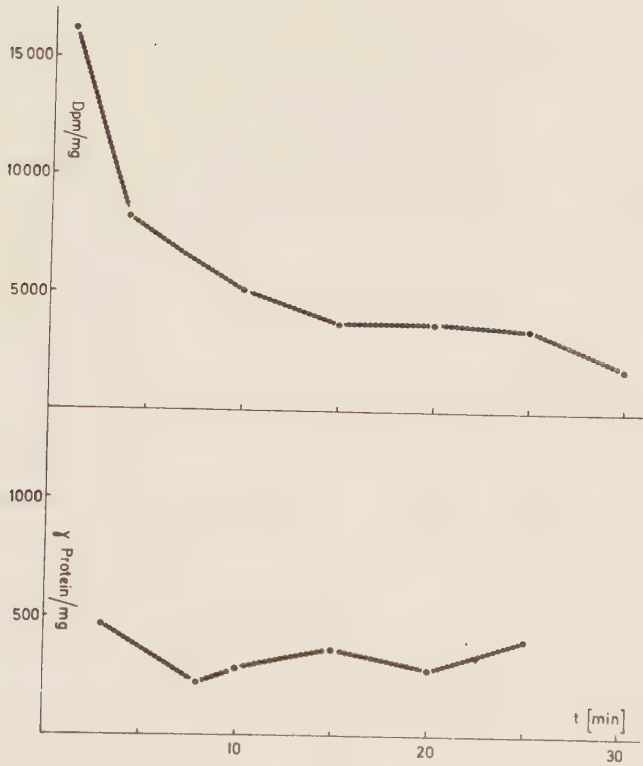


Abb.54: a) Zeitverlauf des radioaktiven Gehalts
des durch Æscin abgelösten Materials
b) Zeitverlauf des Proteingehalts des
abgelösten Materials

Abhängigkeit der Inkubationsdauer ist in Abb. 53 dargestellt. Wegen des hohen Salzgehaltes ergibt sich vor allem bei den niedrigen Inkubationszeiten ein ungenaues Bild über den Zeitverlauf. Eine Verbesserung der Aussage ließ sich durch Säurezusatz (HClO_4) bzw. kurzfristiges Erhitzen des von Zellen befreiten Überstands erreichen, wodurch es zur Fällung von Material kam. Die gravimetrischen Ergebnisse der Gefriertrocknung des gefällten Materials sowie des restlichen Überstands sind in Abb. 53 wiedergegeben.

Man erkennt, daß der größte Anteil, wenn nicht die gesamte Menge der freigesetzten Substanz durch HClO_4 bzw. Hitze fällbar ist. Diese Eigenschaft deutet wiederum auf proteinhaltiges Material hin. Die chemische Analyse des gefällten Materials ergab einen konstanten Proteingehalt des losgelösten Materials während der gesamten Inkubationsdauer (Abb. 54). Benutzt man zur Ablösung des proteinhaltigen Materials radioaktiv markiertes Äscin, so läßt sich durch eine Radioaktivitätsmessung das am Protein haftende Äscin bestimmen. Die Werte der Radioaktivität bezogen auf die freigesetzte Menge proteinhaltigen Materials (Abb. 54) legt den Schluß nahe, daß gleich zu Beginn der Inkubation proteinhaltiges Material freigesetzt wird, das eine hohe Affinität zu Äscin aufweist. Im folgenden Inkubationsverlauf wird dann weiteres nicht ^3H -markiertes Material losgelöst, das die spezifische Aktivität der gesamten freigesetzten Substanz vermindert.

13. Isoelektrische Fokussierung des durch Äscin abgelösten Membranmaterials

Wie bereits besprochen führt die Inkubation von Y.A.T.Z. mit ^3H -Äscin über die Anlagerung im weiteren Verlauf zu freigesetzten Spaltprodukten. Zur Charakterisierung dieser Bruchstücke wurde erneut die Trennmethode der isoelektrischen Fokussierung angewandt. Nach Beendigung der

Auftrennung in die den Partikeln entsprechenden pI -werte, was sich aus der Abnahme und der eintretenden Konstanz des Stromflusses erkennen ließ, wurde die Säule entleert und für jede Fraktion der pH -Werte und die Extinktionswerte bei 260 bzw. 280 mm bestimmt.

Die Auftrennung von Material, das von Zellen während einer 15 bzw. 40 min Inkubation bei $37^{\circ}C$ ohne Äscin-einwirkung abgelöst war, zeigt die Abb. 55. Man erkennt einen großen Absorptionspeak bei dem pH -Wert 4,37 und die Andeutung eines 2. Peaks bei pH 2,46.

Die Ergebnisse der Elektrofokussierung von Membranmaterial, das durch Äscin abgelöst wurde, bieten auf den ersten Blick ein eher verwirrendes Bild (Abb. 56, Tabelle 10, siehe Anhang). Je nach Zeitdauer der Äscineinwirkung und abhängig von vorher erfolgter Dialyse oder Fällung durch kurzzeitiges Erhitzen erhält man neben 2 großen eine Reihe kleinerer Absorptionspeaks. Auf der Suche nach Regelmäßigkeiten fanden sich folgende Fakten:

- a. Bei kürzeren Inkubationszeiten erhält man bei pH 4,37 die stärkste Absorption.
- b. Bei längeren Zeiten wächst die Absorption bei pH 1,53 an und übertrifft die Größe des Absorptionspeaks bei pH 4,37.
- c. Mit steigender Inkubationsdauer wächst die Zahl und die Größe der kleinen Peaks.
- d. Gleichzeitig erfolgt eine Änderung der Lage des 3H -markierten Äscinpeaks von pH 3,54 nach pH 1,53.
- e. Nach einer Hitzefällung ist der Peak bei 4,37 verschwunden, die Peaks bei pH 3,54 und pH 1,53 sind begünstigt und die Zahl der kleineren Peaks wächst.
- f. Die Dialyse der Ausgangslösung oder auch die Dialyse der einzelnen Fraktionen nach der Elektrofokussierung läßt den Absorptionspeak bei pH 2,46 verschwinden.

Gleichzeitig geht auch der Äscinpeak auf einen Bruchteil seiner ursprünglichen Größe zurück.

Mit dem Ziel, aus diesen Einzelinformationen ein mögliches Reaktionsschema abzuleiten, wurden die experimentellen Daten unter verschiedenen Gesichtspunkten in 4 Tabellen zusammengefaßt. Dabei diente der Begriff "Häufigkeit" für das in 26 Versuchen zahlenmäßige Auftreten der einzelnen Peaks innerhalb bestimmter pH-Bereiche.

Tabelle 11: Die Häufigkeit des Vorkommens der einzelnen Peaks innerhalb bestimmter pH-Grenzen

Tabelle 12: Die Häufigkeit des gleichzeitigen Auftretens der einzelnen Peaks

Tabelle 13: Die Häufigkeit des gleichzeitigen Auftretens der einzelnen Peaks, wobei der eine als 1. Hauptpeak und der andere als 2. Hauptpeak fungiert

Tabelle 14: Die Abhängigkeit der Lage der 4 Hauptpeaks von äußeren Bedingungen wie Inkubationsdauer, Erhitzen des Mediums und Dialyse

14. Auftrennung von abgespaltenem Material mittels Gelchromatographie

Das von Äscin abgelöste Oberflächenmaterial wurde über eine Säule getrennt, die mit Sephadex G25 fine (Trennvermögen zwischen Molekulargewichten von 1000 - 20 000) gefüllt war. Angesichts der Ergebnisse der isoelektrischen Fokussierung lassen sich bestimmte Resultate erwarten bzw. voraussagen:

- a. Es sollten mehrere Absorptionspeaks auftreten, wobei das zugrunde liegende Material Beziehungen zueinander aufweisen sollte.
- b. Mit zunehmender Dauer des Ablösungsvorganges und der damit verbundenen fortschreitenden Hydrolyse sollten kleine molekulare Stoffe auftreten, die sich in späteren Fraktionen anfinden sollten.

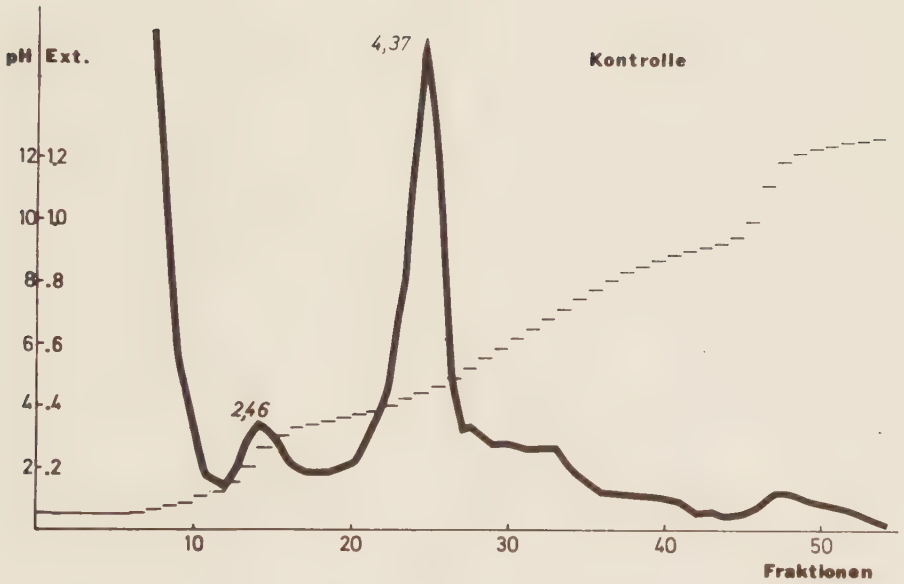


Abb. 55: Isoelektrische Fokussierung von Kontrollmaterial, das während einer 15 min Inkubation freigesetzt wurde. (Die durchgezogene Linie bedeutet die Extinktion bei 280 nm; der pH-Gradient ist gestrichelt eingezeichnet)

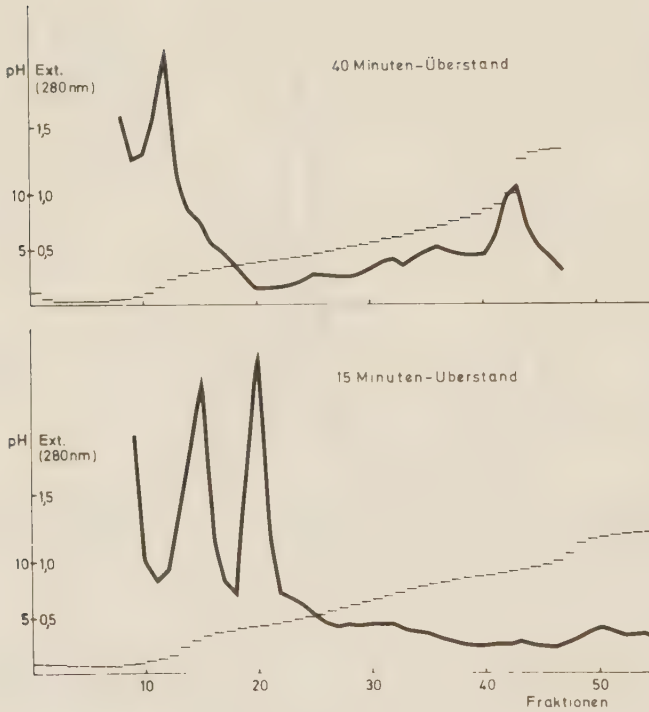


Abb.56: Isoelektrische Fokussierung von Material, das während einer Inkubation von 15 min bzw. 40 min durch Äscin freigesetzt wurde.

Tabelle 11:

Isoelektrische Fokussierung von Zellmaterial, das während der Inkubation freigesetzt wurde. Zahlenmäßiges Vorkommen einzelner Peaks innerhalb bestimmter pH-Grenzen in 26 Versuchen (Häufigkeit).

pH-Intervall:	0,80-1,00	1,20-1,80	2,30-2,80	3,40-3,90	4,20-4,50
Häufigkeit :	1	11	11	22	23
pH-Intervall:	5,50-5,80	6,40-6,80	8,40-8,80	9,30-9,90	11,30-12,0
Häufigkeit :	17	16	13	4	15

Tabelle 12:

Isoelektrische Fokussierung von Zellmaterial, das während der Inkubation freigesetzt wurde. Die Häufigkeit des gleichzeitigen Auftretens der einzelnen Peaks. Ergebnisse aus 26 Versuchen.

1,53	1,53	2,46	3,54	4,37	5,47	6,76	8,76	9,66	11,70
± 0,04	± 0,04	± 0,03	± 0,03	± 0,02	± 0,06	± 0,05	± 0,08	± 0,10	± 0,07
-	2	-	9	10	7	8	6	3	6
2,46	2	-	7	8	6	6	4	4	5
3,54	9	7	-	19	15	12	12	4	14
4,37	10	8	19	-	16	14	12	3	14
5,47	7	6	15	16	-	8	7	4	8
6,76	8	6	12	14	8	-	8	2	8

Tabelle 13:

Isoelektrische Fokussierung von Zellmaterial, das während der Inkubation freigesetzt wurde. Die Häufigkeit des gleichzeitigen Auftretens der einzelnen Peaks wozu bei der eine als 1. Hauptpeak und der andere als 2. Hauptpeak fungiert (26 Versuche).

1. Hauptpeak (Häufigkeit)	1,53	2,46	3,54	4,37	5,47	6,76	8,76	9,66	11,70
Die Häufigkeit als 2. Hauptpeak aufzutreten									
1,53 (3)	-	1	3(1)	3	1	3(1)	1	1(1)	2
2,46 (4)	1	-	1	2(1)	1	3(3)	-	1	-
3,54 (7)	1(2)	4(4)	-	4	2(1)	3	4	-	4
4,37 (10)	4(3)	2(1)	6(6)	-	8	5	4	-	8
5,47 (2)	-	-	2(1)	2(1)	-	-	1	-	1
6,76 (0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Die Zahlen in Klammern nach dem pH-Bereich (in der 1. Spalte der Tabelle) geben die Anzahl der Fälle (von 26) wieder, wo dieser pH-Bereich als 1. Hauptpeak auftritt (somit ergeben die Zahlen in Klammern in der 1. Spalte senkrecht addiert 26).

Die Zahlen in Klammern in den übrigen Spalten schlüsseln die jeweils waagrecht zugehörige Zahl in Klammern in der 1. Spalte näher auf. Der pH-Bereich 1,53 z.B. tritt in 3 von 26 Fällen als 1. Hauptpeak auf, wobei gleichzeitig die pH-Bereiche 3,54 , 6,76 und 9,66 je einmal als 2. Hauptpeak auftreten.

Tabelle 14:

Isoelektrische Fokussierung von Zellmaterial, das während der Inkubation freigesetzt wurde. Die Abhängigkeit der Lage der 4 Hauptpeaks von äußeren Bedingungen wie der Inkubationsdauer, dem Erhitzen des Inkubationsmediums und der Dialyse.

Inkubationsdauer	Zahl d. Versuche	I.	II.	III.	IV. Hauptpeak
15'	9	4,37 (6) 3,54 (2) 2,46 (1)	3,54 (4) 2,46 (4) 5,47 (1)	6,76 (4) 11,70 (3) 5,47 (1) 1,53 (1)	8,76 11,70 5,47 4,37 2,46
20' - 40'	6	2,46 (3) 4,37 (2) 3,54 (1)	6,76 (3) 1,53 (2) 3,54 (1)	6,76 (3) 8,76 (1) 3,54 (1) 9,66 (1)	5,47 3,54 4,37 6,76 8,76 11,70
15' Wärmefällung	7	3,54 (3) 1,53 (2) 5,47 (1) 2,46 (1)	3,54 (1) 1,53 (1) 5,47 (1) 2,46 (1)	4,37 (3) 5,47 (2) 1,53 (1) 2,46 (1)	3,54 (2) 4,37 (2) 5,47 (2) 6,76 (1) 8,76 (1) 11,89 (1)
15' Dialyse	2	4,37 (1) 5,47 (1)	3,54 (1) 4,37 (1)	11,70 (2)	

Die Zahlen in Klammern bedeuten bei der jeweils angegebenen Versuchszahl diejenige Zahl der Fälle, wo dieser pH-Bereich als 1., 2., 3. oder 4. Hauptpeak auftritt.

**Auftrennung des abgelösten Materials durch
Säulenchromatographie**

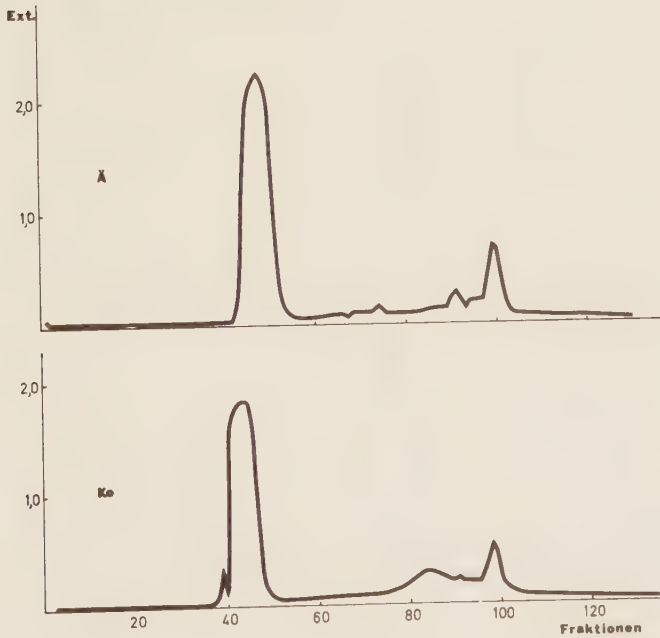


Abb. 57: Auftrennung von abgelöstem Zellmaterial,
das während einer 7 min Inkubation mit
bzw. ohne Äscin abgelöst wurde.

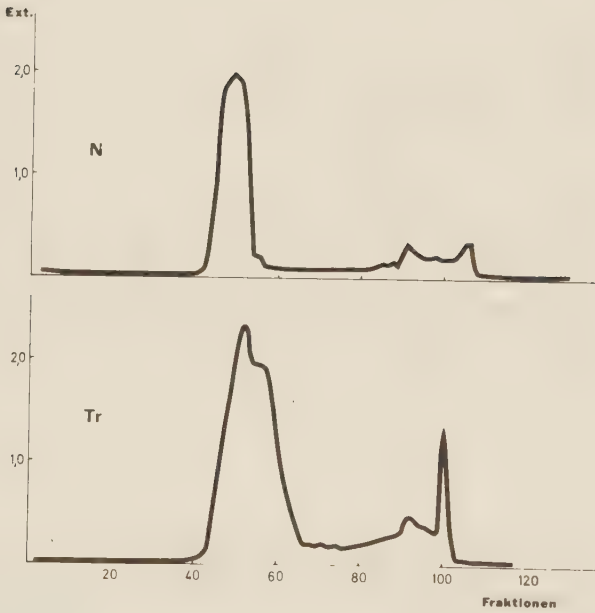


Abb.58: Auftrennung von Zellmaterial, das während einer 7 min Inkubation mit Trypsin bzw. Neuraminidase abgelöst worden war

Tabelle 15:

Trennungen mittels Gelchromatographie (Sephadex G25 fine). Häufigkeit des Vorkommens der einzelnen Peaks bei bestimmten Fraktionsnummern. Ergebnisse aus 21 Trennungen.

Fr. Nr.:	40/44	46/50	59/63	69/73	77/80	84/87	90/94
Anzahl :	15	7	6	3	12	9	19

Tabelle 16:

Trennungen mittels Gelchromatographie (Sephadex G25 fine). Gleichzeitiges Auftreten der einzelnen Peaks.

Ergebnisse aus 21 Trennungen.

	40/44	46/50	59/63	69/73	77/80	84/87	90/94
40/44	-	3	6	2	10	6	14
46/50	3	-	-	1	2	3	6
59/63	6	-	-	-	5	1	5
69/73	1	1	1	-	1	1	3
77/80	10	2	5	1	-	1	11
84/87	6	4	1	2	1	-	9
90/94	14	6	5	3	11	9	-

Trennungen mittels Gelchromatographie (Sephadex G25 fine). Gleichzeitiges Auftreten der einzelnen Peaks unter besonderer Berücksichtigung des 1. und 2. Hauptpeaks.
Ergebnisse aus 21 Trennungen.

1. Hauptpeak: Gleichzeitiges Auftreten; (in Klammern: Häufigkeit als
(in Klammern: 2. Hauptpeak aufzutreten)
Häufigkeit)

	40/44	46/50	59/63	69/73	77/80	84/87	90/94
40/44 (12)	-	-	-6(-)	1(-)	9(5)	4(3)	11(6)
46/50 (3)	-	-	-	-	1(1)	2(1)	3(1)
59/63 (-)	-	-	-	-	-	-	-
69/73 (-)	-	-	-	-	-	-	-
77/80 (1)	-	-	-	-	-	-	1(1)
84/87 (4)	2(1)	2(2)	-	1(1)	-	-	4(-)
90/94 (1)	1(-)	1(-)	-	-	1(1)	-	-

(Hinweis: In der Tabelle ist bei dem Fraktionsbereich 40/44 in der 1. Spalte die Häufigkeit 12 angegeben, d. h. daß in diesem Bereich in 12 Fällen von 21 Trennungen der Hauptpeak liegt. Die Zahlen in Klammern in der 1. waagerechten Spalte ergeben addiert 14, d. h. daß in 14 Fällen neben dem 1. Hauptpeak gleichzeitig ein 2. Hauptpeak auftritt. Die Diskrepanz zu der Häufigkeit (12) des 1. Hauptpeak erklärt sich, daß in 2 Fällen im Fraktionsbereich 77/80 und 90/94 Peaks vorlagen, die sich in ihrer Größe optisch nicht unterscheiden ließen und deshalb doppelt gezählt wurden.)

Abb. 57 stellt das typische Bild einer Gelchromatographiefraktionierung von Oberflächenmaterial dar, das während einer 7 min Inkubation durch Äscin freigesetzt wurde.

Zum Vergleich mit Äscin wurde das Ablösungsvermögen der beiden Spaltenzyme Trypsin und Neuraminidase untersucht (Abb. 58). Abgesehen von der Fraktionsnummer, die sich aufgrund wiederholter Leerung und Füllung der Säule wegen der etwas unterschiedlichen Füllmenge des Sephadexgels veränderte, wiesen die Absorptionsspektren der unterschiedlichen Proben trotzdem beträchtliche Ähnlichkeiten auf. Um die Überstände aus mehreren Versuchen miteinander vergleichen zu können, wurde folgendes Verfahren angewandt.

Der schmale, oft hohe Peak, der gemäß Abb. 59 in einem Molekulargewichtsbereich von etwa 100 liegt, wurde als repräsentativ für alle Absorptionsspektren dieser Zellüberstände angesehen. Das Maximum dieses schmalen Peaks im Bereich der Fraktionsnummern 89 - 102 wurde willkürlich auf Nr. 92/93 festgelegt. Danach wurden alle anderen Peaks proportional zu diesem definierten Standardpeak angeordnet. Diese veränderten, neuen Spektren ließen sich jetzt direkt miteinander vergleichen.

Analog der isoelektrischen Fokussierung wurden die Ergebnisse von 21 Trennungen unterschiedlich durchgeführter Ablösevorgänge nach verschiedenen Gesichtspunkten zusammengefaßt. In Tabelle 15 ist angegeben, wie häufig die jeweiligen Peakmaxima innerhalb eines bestimmten Fraktionsintervalls erscheinen. Die Absorptionsgipfel in den Bereichen 40/44, 77/80 und 90/94 traten am häufigsten auf. Um analog der isoelektrischen Fokussierung auf eventuelle Beziehungen der Peaks untereinander schließen zu können, ist in Tabelle 16 die Anzahl der Fälle zusammengestellt, in denen die einzelnen Peaks gleichzeitig vorkommen.

Tabelle 17 gibt ferner darüber Aufschluß, wie häufig bei vorgegebenen 1. Hauptpeak ein weiterer Peak gleichzeitig vorkommt und wie häufig (Anzahl in Klammern) dieser 2. Peak als zweitgrößter Peak vorliegt.

Peak 40/44 tritt am häufigsten als größter auf, während die Peaks 77/80, 90/94 und 84/87 gleichzeitig die Stelle des zweitgrößten einnehmen.

In Tabelle 18 (siehe Anhang) sind die Ergebnisse der gravimetrischen Bestimmung und der chemischen Analyse desjenigen Materials zusammengestellt, das während einer 7 min Inkubation in Ringerphosphatmedium ohne Zusätze bzw. durch Äscin, Trypsin und Neuraminidase abgelöst wurde.

Im Bereich niedriger Fraktionswerte (Peakmaximum 40/44) findet man nur 6 - 8 % des eingesetzten Materials, das aber einen hohen Protein- (ca. 35 - 55 %) und Zuckergehalt (5 - 8 %) besitzt. Der Sialinsäureanteil ist nur bei Material, das durch Trypsin oder Neuraminidase abgelöst wurde, gegenüber Kontrollen erhöht.

Bei höheren Fraktionsnummern (Peakmaximum 84/87 und 90/94) liegen größere Gewichtsanteile des eingesetzten Materials (15 % bzw. 30 %) mit einem nur geringen Protein- (0,5 - 1,5 %, bei Trypsin 3 - 6 %), Zucker- (ca. 1 %) und Sialinsäureanteil (0,05%) vor. Dieses fraktionierte Material besteht hauptsächlich aus den anorganischen Salzen des Inkubationsmediums.

15. Markierung von oberflächlichen Membranbestandteilen

Die Inkubation der Zellen in Fucose-haltigem Medium führte zur Aufnahme dieses Zuckers in die Zellen (Abb. 60). Nach etwa 30 min wird ein Plateau erreicht, der Transfer in die Zelle kommt scheinbar zum Stillstand. Nach Mediumwechsel wurde durch Zusatz von Äscin zu den Fucose-beladenen Zellen das Ablösungsvermögen dieses Saponins an Hand des freigesetzten markierten Materials ermittelt. Aus Abb. 60 ist ersichtlich, daß bereits eine 40 min Inkubation ohne Äscinzusatz im H_2O -Bad bei 37°C einen

beträchtlichen Teil des markierten Materials in das Medium freisetzt. Äscin jedoch beschleunigt die Abgabe erheblich. Innerhalb von 6 min ist das radioaktiv markierte Material beinahe vollständig losgelöst. Bereits nach 1 - 2 min erhält man eine vergleichbar große Menge markierten Materials wie nach einer 40 min Inkubation ohne Äscinzusatz. Außerdem läßt sich erkennen, daß Fucose-markierte Zellen, auf die Äscin nur kurze Zeit (bis 4-6 min) eingewirkt hatte, nach Abzentrifugieren und Waschen gegenüber Kontrollzellen einen wesentlich höheren Teil der Radioaktivität ins Waschmedium abgeben.

Mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung und der Säulenchromatographie wurde versucht, das Fucose-markierte Material näher zu analysieren und vor allem auszuschließen, daß es sich bei dem freigesetzten Material um unveränderte Fucose handelt.

Die isoelektrische Fokussierung führte zu einer nahezu einheitlichen Lokalisierung des Fucose-haltigen Bestandteils (Abb. 61). Im stark sauren Bereich zwischen dem pH-Wert von 1,3 - 1,8 (Mittelwert $1,52 \pm 0,07$) lag der ^{14}C -Fucose-haltige Gipfel. Nur ein geringer Anteil der Fucoseaktivität war über die ganze Säule verteilt.

Die Dialyse des abgelösten Fucose-haltigen Materials, die zur Entfernung der Salze und zur Anreicherung der ^{14}C -haltigen Bestandteile durchgeführt wurde, hatte einen beinahe vollständigen Verlust der Radioaktivität und außerdem eine Verschiebung der Peaklage im pH-Gradienten zur Folge.

Zur weiteren Charakterisierung wurde dieses mit Fucose markierte abgelöste Material auf die Sephadexsäule gebracht und fraktioniert (Abb. 62). Im Gegensatz zur isoelektrischen Fokussierung spaltete sich das Fucose-haltige Produkt bei der Trennung nach Molekülgröße in 4 unterscheidbare Fraktionen auf (Tabelle 18^{+)).}

Am häufigsten zeigten sich Peaks in den

⁺) s. Anhang

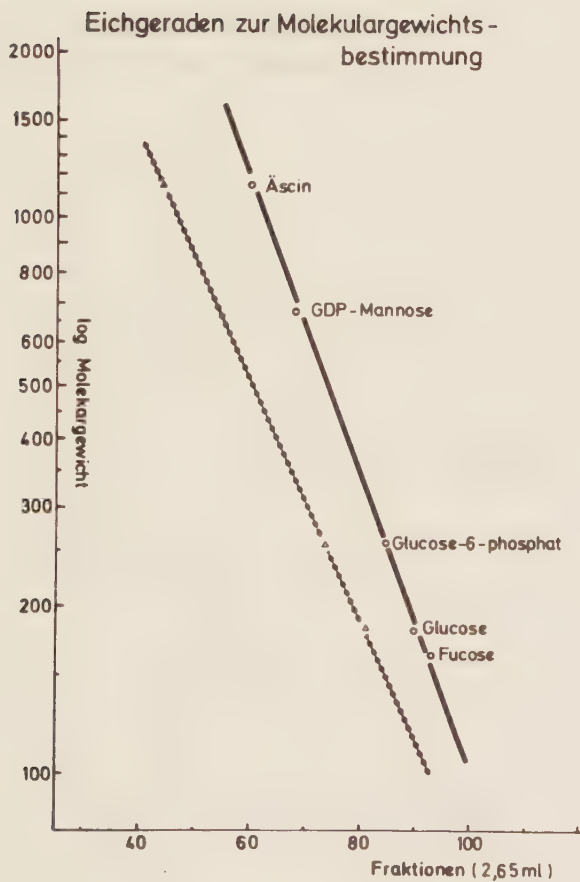


Abb. 59

Abgabe von ^{14}C -markiertem Material ans Medium durch Aescin
(Vorinkubation mit ^{14}C -Fucose für 30 min)

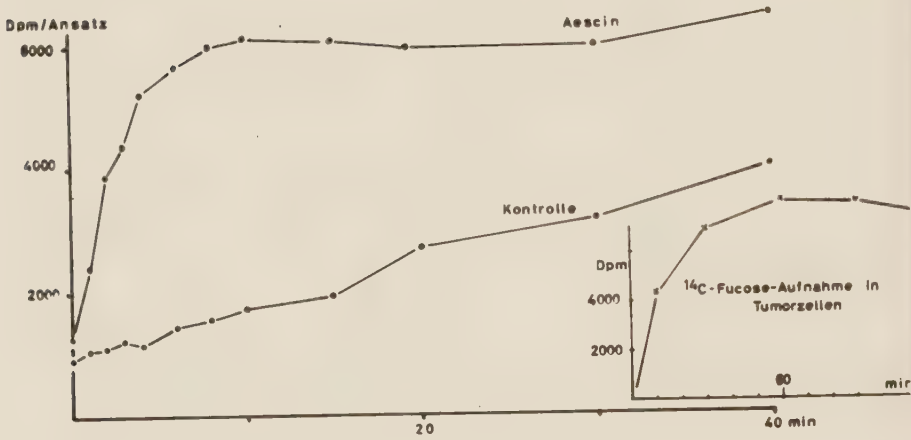


Abb. 60

Fraktionsbereichen 81/84 und 91/94 (je 5 x von 6 Versuchen). Daneben lagen Peaks bei den Fraktionsnummern 67/70 und 58/61 vor. Der Peak bei 58/61 scheint für die Äscineinwirkung charakteristisch, da er bei Zellen, die unter Kontrollbedingungen oder mit Trypsin bzw. Neuraminidase inkubiert waren, nicht in Erscheinung trat.

16. Regenerierung von abgelöstem Membranmaterial

Y.A.T.Z. - die 1 h mit $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Fucose vorbehandelt waren und von denen durch Äscin ($3 \times 10^{-5}\text{M}$), Trypsin (0,5 mg/ml Zellsuspension) und Neuraminidase (0,5 mg/ml Zellsuspension) in einer 7 min Inkubation Oberflächenmaterial abgelöst war - wurden im Ringerphosphatmedium mit Zusatz von $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glukose 3 h bei 37°C in der Absicht inkubiert, daß aus der markierten Glukose markiertes Oberflächenmaterial nachgebildet würde.

In Abb.63 ist der Gehalt an Radioaktivität in den Zellen und im Medium und die gleichzeitige CO_2 -Entwicklung während der 3h-Inkubation dargestellt.

Der Gehalt der Zellen an radioaktivem Material zeigte zwischen Kontrollzellen und Äscin-, Trypsin- und Neuraminidase-behandelten Zellen keinen Unterschied und wies bereits nach 10 min Inkubationsdauer eine fallende Tendenz auf, d. h. daß der schnelle Einstrom der Glukose in die Zellen bereits nach 10 min durch den steigenden Austritt von Stoffwechselprodukten (CO_2 , Lactat usw.) und vorhandener ^{14}C -Fucose überkompensiert wurde.

Der Gehalt des Mediums an Radioaktivität durchlief bei Kontrollzellen und Trypsin- und Neuraminidase-behandelten Zellen bei 30 min ein Minimum, d. h. daß ab diesem Zeitpunkt der Ausstrom von radioaktivem Material den Einstrom an radioaktiver Glukose überwog. Die Diskrepanz im zeitlichen Verlauf des radioaktiven Gehalts von Medium und Zellen läßt sich möglicherweise durch den Waschvorgang der Zellen nach der Inkubation erklären.

Bei Äscin-behandelten Zellen ergab sich im Medium nach 30 min ein Maximum des radioaktiven Gehalts. Außerdem

war die $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung gegenüber Kontrollzellen und Trypsin- und Neuraminidase-behandelten Zellen nach etwa 90 min vermindert.

Aus Abb.64 läßt sich ersehen, welche Menge an Radioaktivität nach der 3h-Inkubation und der anschließenden 15min-Trypsin-einwirkung in den einzelnen Zellproben verbleibt bzw. in das Medium abgelöst wird. Der Kurvenverlauf der Radioaktivität in den Zellen ähnelt dem radioaktiven Gehalt der Zellen während der 3h-Inkubation. Der Unterschied besteht in der Menge an markiertem Material, das durch die 15min-Trypsineinwirkung aus den Zellen freigesetzt wird.

Der Gehalt des Mediums an radioaktivem Material, das durch die 15min-Einwirkung von Trypsin freigesetzt wurde, durchläuft bei 30 min der 3h-Inkubation ein Maximum, d. h. - wie bereits indirekt an Hand des Minimums des ^{14}C -Gehalts des Mediums in Abb.63 ersichtlich - daß während der 3h-Inkubation die Zellen nach 30 min den größten Gehalt an radioaktivem Material besaßen.

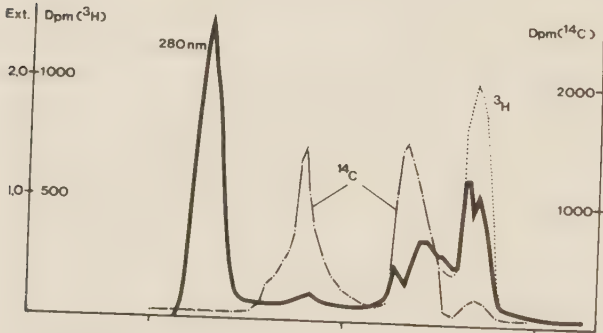
In Abb.65 ist das Fluoreszenzvermögen und der Protein-, Zucker- und Sialinsäuregehalt des Materials dargestellt, das (wie Abb.64 zeigt) während der 15min-Nachinkubation durch Trypsin losgelöst wurde. Allein das abgelöste Material von Trypsin-vorbehandelten (7 min) Zellen weist im Medium mit ANS Fluoreszenzvermögen auf. Der Gehalt an Protein, Zucker und Sialinsäure im freigesetzten Material als Funktion der Inkubationszeit hat große Ähnlichkeit mit dem Kurvenzug der freigesetzten Radioaktivität und verläuft ebenfalls durch ein Maximum bei etwa 30 min.

In der Abb.66 sind Versuchsergebnisse dargestellt, wenn an Stelle der radioaktiven Fucose in der Vorinkubation und der radioaktiven Glucose in der Hauptinkubation dem Medium ^{14}C -Glukosamin zugesetzt wurde. Die Abnahme von Glukosamin im Medium erfolgte in den ersten 10 min der 90min-Inkubation sehr rasch bis zu einem Plateau. Dementsprechend ließ sich in den Zellen in den ersten 10 min eine schnelle Zunahme der Radioaktivität registrieren. Die 15 min Trypsinbehandlung in der Nachinkubation löste radioaktiv markiertes Material ab, dessen Menge nach 10 min ebenfalls ein Plateau erreichte.

Der Einschub in Abb.66 zeigt die Zahl der toten Zellen während der 90min-Inkubation nach der 7min-Behandlung mit Ascin, Trypsin und Neuraminidase.

Auftrennung des abgelösten Materials durch
Säulenchromatographie (Sephadex G 25 fine)

Äscin



Kontrolle

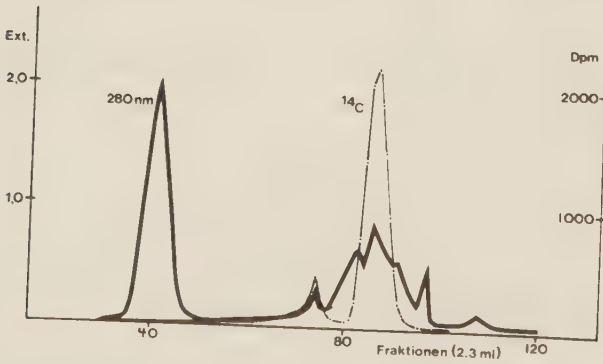


Abb.62

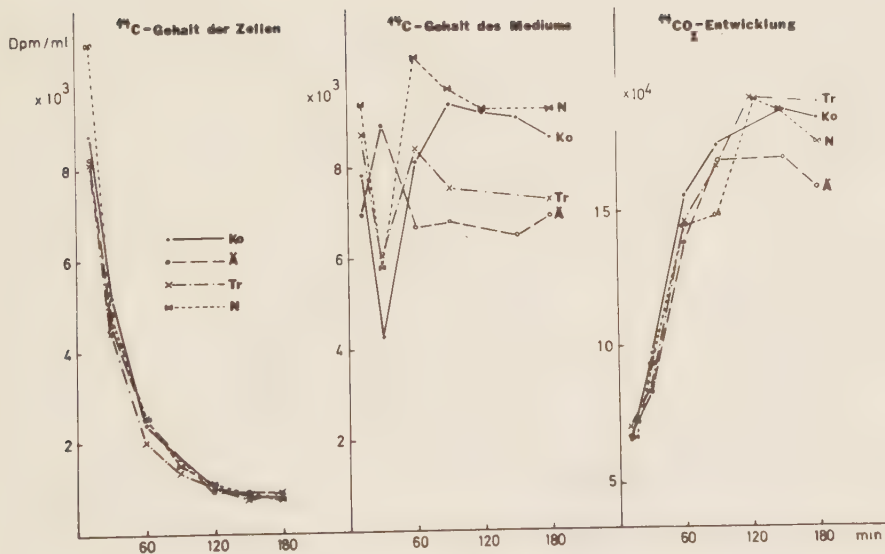


Abb.63: Glukoseverbrauch von Zellen, die 7 min mit Äscin, Trypsin und Neuraminidase vorbehandelt waren.

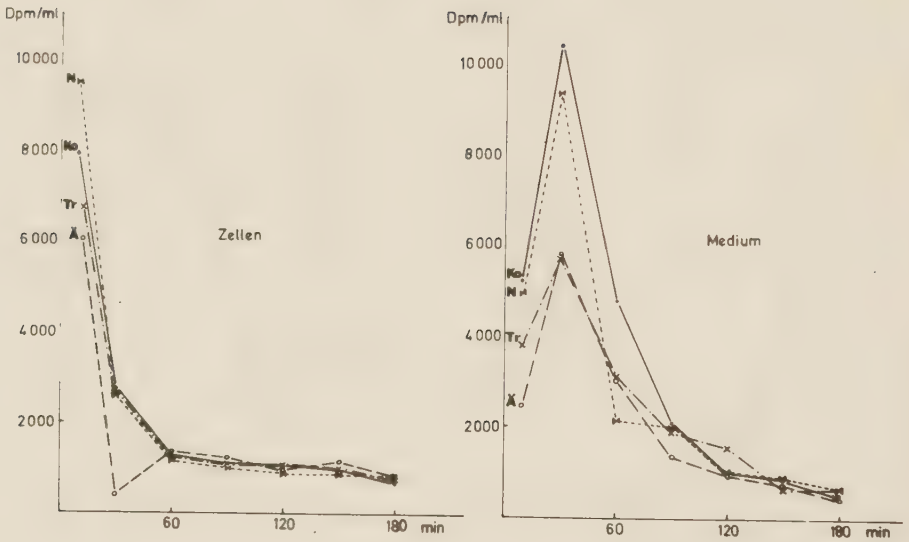


Abb. 64: ^{14}C -Radioaktivität, die in einer 3h-Inkubation in die Zellen aufgenommen wurde und nach 15 min Trypsineinwirkung in den Zellen verblieb bzw. in das Medium abgegeben wurde.

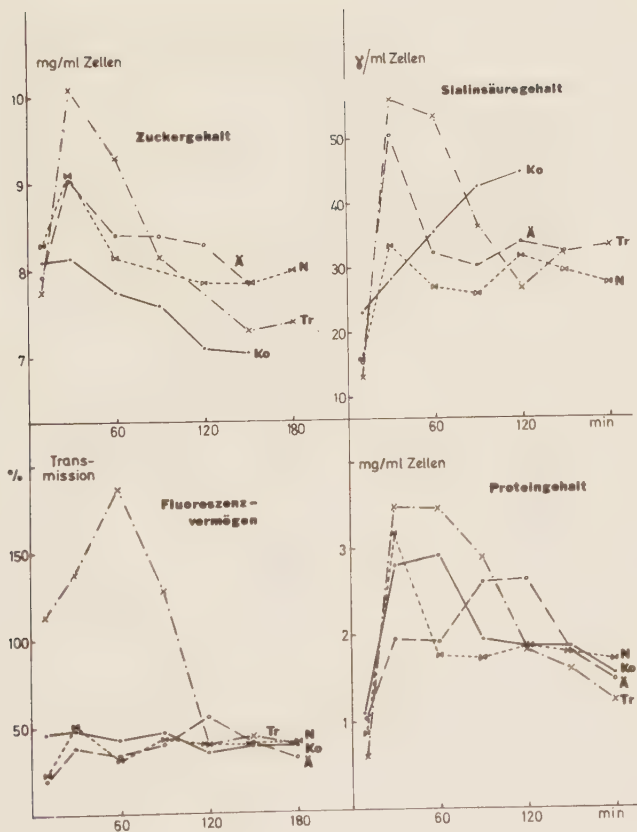


Abb.65: Fluoreszenzvermögen sowie Protein-, Zucker- und Sialinsäuregehalt des in der 15 min Nachinkubation durch Trypsin freigesetzten Materials.

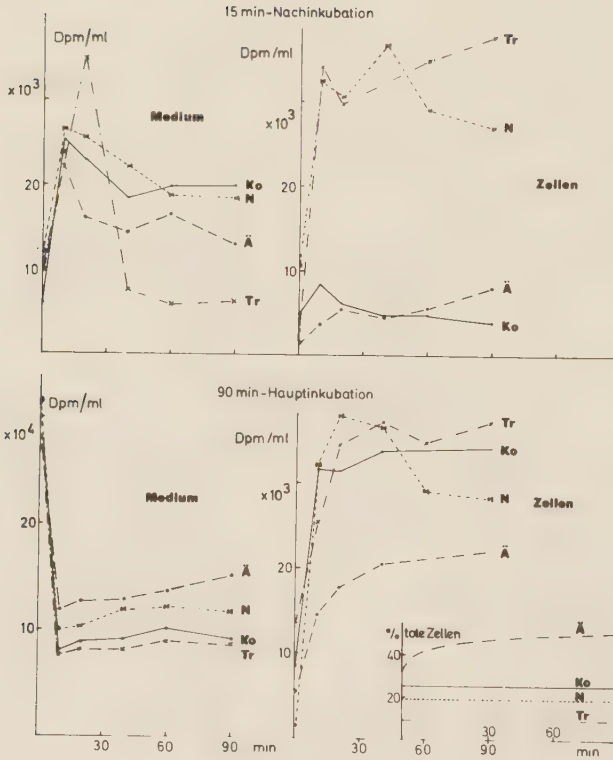


Abb.66: (unten) Abnahme des radioaktiven Gehalts im Medium bzw. Zunahme des radioaktiven Gehalts in den Zellen während einer 90min-Inkubation von Y.A.T.Z. in Ringerphosphatmedium mit Zusatz von ^{14}C -Glukosamin.

(oben). Das durch Trypsin in der 15min-Nachinkubation ins Medium abgelöste radioaktive Material bzw. die nach der Trypsinbehandlung in den Zellen verbleibende Radioaktivität.

(vgl. Text S.180)

F. DISKUSSION

I. Fettgewebe

Äscin zeigt bei Transportvorgängen und beim Stoffwechsel des Fettgewebes in mancher Hinsicht Insulin-ähnliches Verhalten. Der Einfluß von Äscin und Insulin auf den Transport und damit das Ausmaß der Verstoffwechslung ist je nach Aminosäure unterschiedlich. So wird die nicht metabolisierbare α -Aminoisobuttersäure (Kipnis und Noall, 1958) im Fettgewebe während der Inkubation in Glukose-haltigem Medium unabhängig vom Äscin- und Insulinzusatz angereichert. Glycin und Leucin dagegen werden durch Äscin und Insulin vermehrt in das Gewebe aufgenommen. Die Insulinergebnisse decken sich mit Befunden von Goodman (1964, 1966), Herrera und Renold (1960). Daß die Verwertung einer Aminosäure in der Zelle die durch Insulin stimulierte Aufnahme aber entscheidend beeinflusst, scheint zweifelhaft, da z. B. der α -AiB-transfer in Zwerchfellmuskeln durch Insulin gesteigert werden kann (Akedo und Christensen, 1962; Kipnis und Noall, 1958).

Die Insulinwirkung auf die $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung beim oxidativen Abbau von 1- ^{14}C -Aminosäuren zeigt ebenfalls je nach Aminosäure unterschiedliche Ergebnisse. Eine kleine Insulinkonzentration (3 mU/ml) erzielt keinen Effekt beim Glycinabbau. Eine höhere Insulinkonzentration (100 mU/ml) aber stimuliert den Glycinabbau (Herrera und Renold, 1960). Die CO_2 -Bildung aus 2- ^{14}C -Leucin wird gehemmt (Goodman, 1964) aus 1- ^{14}C -Leucin dagegen erhöht (v.Bruchhausen, Herken, 1966).

Der Einfluß von Äscin auf den Aminosäurenverbrauch des Fettgewebes richtet sich nach der Konzentration des Saponins. In kleineren Konzentrationen weist Äscin beim Aminosäuretransfer Insulin-

ähnlichen Charakter auf. Die Wirkung ist jedoch weniger ausgeprägt. Die CO_2 -Bildung aus Aminosäuren bleibt durch Äscin unberührt.

Mit steigender Konzentration hemmt Äscin sowohl die Aminosäureaufnahme wie auch die CO_2 -Bildung. Gleichzeitig verringert sich der AS-Raum, ein Maß der Anreicherung, bei einer Konzentrationszunahme des Äscins von 3×10^{-6} auf 3×10^{-5} auf ca. 46 %, während sich der EC-Raum bei 3×10^{-5} gegenüber Kontrollen um ca. 50 % vergrößert. Dieser Befund läßt daran denken, daß der primäre Angriffspunkt des Äscins die Plasmamembran ist.

Auch viele andere Substanzen hemmen Transportvorgänge. Den Aminosäuretransport ins Fettgewebe verringern u.a. N^6, O^2 -Dibutyryl-Adenosin-3,5-Phosphat (v. Bruchhausen, 1968) und Stoffwechselgifte wie Dinitrophenol, Jodacetat und Natriumazid (Goodman, 1966). Jodacetat vergrößert wie Äscin den Extrazellulärraum. Trotz ähnlicher Wirkung muß aber bei so unterschiedlichen Stoffen, die intra- und extrazellulär wirken, nicht derselbe Hemmmechanismus vorliegen.

Wie beim Aminosäuretransfer zeigt Äscin in Abhängigkeit seiner Konzentration auch für den Glukosetransport ins Fettgewebe "biphasischen" Charakter. In kleinen Konzentrationen stimuliert Äscin die CO_2 -Bildung aus $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glukose, ein annäherndes Maß für deren Abbau über den Pentosephosphatweg. In dieser Insulin-ähnlichen Wirkung gleicht Äscin so unterschiedlichen Substanzen wie den Proteasen Trypsin, Chymotrypsin, Papain und Ribonuclease (Rieser und Rieser, 1964; Kuo et al., 1966; Kuo et al., 1967; Kuo, 1968; Kono, 1969; Weis und Narahara, 1969), den Phospholipasen A und C (Blecher, 1966, 1967, 1969; Rodbell, 1964; Rodbell und Jones, 1966), der Neuraminidase (Cuatrecasas, 1971b), dem Hormon Oxytocin (Braun et al., 1969), dem Antibiotikum Filipin (Kuo, 1968), dem SH-Gruppenreagenz p-Chlormercuribenzolsulfonat (Minemura und Crofford, 1964) und dem Elektronenacceptor Phenazinmethosulfat (Kotner et al., 1972).

Allen diesen Agentien ist die Stimulierung des Glukoseverbrauchs gemeinsam und dabei einigen ihre Wirkung auf die Oberfläche bekannt ist, kann man wiederum erwarten, daß die Plasmamembran der primäre Ort auch des Äscinangriffs ist. In diesem Zusammenhang ist der Befund von Blecher (1967) erwähnenswert, wonach auch Stoffe der Membran, z. B. Phosphatidylcholin und Phosphatidyläthanolamin, auf den Glukosetransport eine biphasische Wirkung ausüben. So könnten Reagenzien, welche die Konzentration dieser beiden Membrankomponenten beeinflussen sekundär eine Änderung des Transports verursachen.

In höheren Konzentrationen übt Äscin hingegen einen hemmenden Einfluß auf den Glukosetransport aus. Diesen biphasischen Charakter weisen auch die Isomeren α -Äscin und β -Äscin auf, die sich in ihrer Wirkung nur in der Größe der maximalen Stimulierung und in der dazu erforderlichen Konzentration unterscheiden. Das hydrierte Produkt erreicht die größte Stimulierung, allerdings bei einer Konzentration, die mehr als das 100-fache der maximal stimulierenden Äscinkonzentration beträgt. Dieser deutliche Unterschied und der erhöhte Schmelzpunkt lassen vermuten, daß es sich hier nicht nur um das an der Tiglinsäure hydrierte Produkt handelt, sondern daß bei der Hydrierung möglicherweise auch die Doppelbindung bei C-12 und C-13 reduziert wurde. Da die Konformation des hydrierten Produkts und die des α -Äscins nicht bekannt sind, Äscinol und Äscigenin aber wenig wasserlöslich sind, läßt sich über den möglichen Einfluß einzelner Gruppen am Äscin nichts aussagen.

Die stimulierende Wirkung des Äscins auf die CO_2 -Bildung aus Glukose im Fettgewebe läßt sich durch Auswaschen des Saponins wieder beseitigen. Insulin in kleinen Konzentrationen zeigte ähnliches Verhalten (Minemura und Crofford, 1969). Dieser Befund bestärkt die Vermutung, daß die Äscinwirkung an der Fettgewebsmembran ansetzt und daß außerdem die Bindung von Äscin an das

Gewebe nur mäßig stark ist. Die Äscinwirkung könnte nach der Fixierung von Äscin an die Membran aus reversiblen Veränderungen der Membran bestehen (Tabelle 4). Nach Avruch et al. (1972) könnten die verursachten Veränderungen allenfalls sehr gering sein. So ließen sich an Membranen von Fettzellen, deren Glukosetransportsystem noch intakt war, nach Einwirkung von Insulin mittels Infrarotspektroskopie, Fluoreszenzanalyse und Messung der natürlichen Eigenfluoreszenz der Membranproteine im Vergleich zu nicht-stimulierten Membranen keine Unterschiede feststellen.

Die Untersuchung der Kinetik des Glukosetransports liefert eine weitere Aussage über den Charakter der Äscinstimulierung. Aus dem Lineweaver-Burk Diagramm (Abb. 10) ist abzulesen, daß sich die Transportkonstante K_m nicht ändert, d. h. daß sich die Affinität der Glukose zum Transportsystem durch die Äscinstimulierung nicht erhöht. Die maximale Geschwindigkeit V_{max} wächst dagegen an, d. h. die maximal durchgesetzte Glukosemenge vergrößert sich. Entsprechende Verhältnisse wurden für den durch Insulin-stimulierenden Transport gefunden (Proesch und Ginsberg, 1962; Hernandez und Sols, 1963; Narahara und Özand, 1963; Denton et al., 1966; Kuo et al., 1967b; Caygill und Stein, 1967; Weiss und Narahara, 1969).

Aus dem Lineweaver-Burk Diagramm ließen sich an Hand der hemmenden Konzentrationen von Äscin, α -Äscin und β -Äscin nicht kompetitive Hemmungen des Glukosetransports ermitteln (Tabelle 6). Analoge Ergebnisse lieferten auch andere Hemmstoffe des (Insulin-stimulierten) Glukosetransports wie Phlorrhizin (Frerichs und Ball, 1964; Kuo et al., 1967a), Triamteren (v. Bruchhausen et al., 1967) und Amilorid (v. Bruchhausen et al., 1969).

Die mehrstündige Inkubation von Fettgewebe führt zur Spaltung von Fett (Lipolyse) und damit zur Freisetzung von Glycerin. Äscin verringert wie Insulin (Jungas und Ball, 1963) die Lipolyse (Abb. 15). Auch die Erhöhung der Lipolyse durch Wachstumshormon und Dexamethason (Fain et al., 1965, 1966) wird von Äscin wie

Insulin in ähnlichem Umfang gehemmt (Abb. 16). Die antilipolytische Wirkung von Insulin ist noch ungeklärt und widersprüchlich interpretiert worden. Nach Butcher et al. (1966, 1967, 1968) soll die Lipolyse im Fettgewebe durch cyclisches Adenosin-3.5-monophosphat (cAMP) gesteuert werden. Dementsprechend könnte die antilipolytische Wirkung des Insulins auf einer Erhöhung der Phosphodiesteraseaktivität (Senft et al., 1968) bzw. einer Hemmung der Adenylcyclaseaktivität beruhen (Jungas, 1966). Andererseits kann aber die durch Dibutyryl-cAMP gesteigerte Lipolyse durch Insulinzusatz noch erhöht werden (Goodman, 1969).

Einen möglicherweise entscheidenden Schritt zur Klärung der Insulinwirkung auf die Lipolyse stellen jüngste Befunde von Clausen et al. (1974) dar. Danach erhöht Insulin die intrazelluläre Ca^{++} -Konzentration. Ca^{++} seinerseits aber hemmt die Adenylcyclase (Vigdahl et al., 1969; Rasmussen und Nagata, 1970) und aktiviert die Phosphodiesterase und verringert auf diese Weise die Konzentration an cAMP. Analog diesen Vorstellungen über die Insulinwirkung könnte die antilipolytische Wirkung von Äscin ebenfalls auf einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{++} -Konzentration beruhen. Die mögliche Aktivierung der Phosphodiesterase oder die Hemmung der Adenylcyclase sind allenfalls Effekte sekundärer Natur.

Neben der Möglichkeit, daß die Äscinwirkung nach der Anlagerung des Saponins an die Zelloberfläche auf einer geringfügigen strukturellen Veränderung der Membran beruht, könnte Äscin neben der Mobilisierung von intrazellulärem, freiem Ca^{++} noch weitere Stoffe aus der Membran oder der Fettzelle freisetzen, die ihrerseits die beobachteten Effekte hervorrufen. Die Auftrennung der Inkubationsüberstände mittels Säulenchromatographie ließ geringfügige Unterschiede in der Zusammensetzung der einzelnen Fraktionen von Kontroll-, Insulin- und Äscin-behandelten Gewebe erkennen (Abb. 18). Äscin scheint gegenüber Kontrollgewebe und Insulin-behandelten Gewebe

eine proteinreiche Substanz mit höherem Molekulargewicht loszulösen. Allerdings ist der Anteil dieser Substanz an der Gesamtmenge sehr gering. Aus diesem Grund konnte auch in der Fluoreszenzanalyse der verschiedenen Überstände kein Unterschied festgestellt werden.

Wie aus zahlreichen Befunden hervorgeht, wird der nichtmetabolisierbare Zucker 3-O-Methylglukose ebenfalls durch das Transportsystem der Glukose befördert (Morgan et al., 1961, 1964; Narahara und Ozand, 1963; Saha et al., 1968). Die gegenseitige Hemmung der beiden Zucker läßt sich als Kompetition an demselben Carriersystem erklären (Crofford und Renold, 1965; Rodbell, 1966; Minemura und Crofford, 1969; Weis und Narahara, 1969). Aus der Tatsache, daß die Stimulation des Glukosetransports durch Insulin und Äscin durch Zusatz von 3-O-Methylglukose in gleicher Weise gehemmt wird (Abb. 20) kann man annehmen, daß Insulin und Äscin dasselbe Glukosetransportsystem beeinflussen. Daher läßt sich erwarten, daß bei gleichzeitigem Einwirken von Insulin und Äscin in optimal stimulierenden Konzentrationen der Glukosetransport nicht synergistisch erhöht wird (Abb. 19). In diesem Sinn zeigten auch die Kombinationen von Insulin mit Phospholipase A (Blecher, 1967), mit Phospholipase C (Blecher, 1965) und mit Trypsin (Weis und Narahara, 1969) keine additive Wirkung bei der Stimulation des Glukosetransports. Gegenüber Albumin und Substanzen mit SH-Gruppen wie β -Mercaptoäthanol und Dimercaptopropanol und veränderten Konzentrationen von 2-wertigen Ionen im Medium zeigten Äscin und Insulin unterschiedliches Verhalten. Während die Stimulierung des Glukosetransports durch Äscin gegenüber β -Mercaptoäthanol unverändert bleibt, ist Insulin in seinem Stimulationsvermögen durch den möglichen Disulfidaustausch empfindlich gestört (Tabelle 8). Insulin als Molekül mit Disulfidbrücken und auch p-Chlormercuribenzolsulfonat (Minemura und Crofford, 1969)

könnten SH-Gruppen austauschen. Dabei verringert sich ihre stimulierende Wirkung.

Die Äscinstimulierung wird durch Albumin völlig aufgehoben, während die Insulinwirkung nicht beeinträchtigt wird (Abb.22). Dieser Effekt ist verständlich, da nach Vogel und Marek (1962) und nach Henschler et al. (1971) Albumin mit Äscin eine Anlagerungsverbindung im stöchiometrischen Verhältnis von 2:1 eingeht und auf diese Weise das freie Saponin aus dem Medium entfernt.

Der Ca^{++} - und Mg^{++} -Gehalt des Mediums beeinflusst die CO_2 -Bildung aus Glukose im Fettgewebe beträchtlich. Die 15 min Vorbehandlung mit EDTA (Abb.11, 12, 13), die zu Ca^{++} - und Mg^{++} -freiem Gewebe führte, verringerte die basale Glukoseaufnahme auf ein Minimum und beseitigte die stimulierenden Effekte von Insulin und Äscin auf den Glukosetransport. Nach einer EDTA-Behandlung kann der Glukoseverbrauch nur durch Zugabe von Ca^{++} wieder erhöht werden. Die zusätzliche Anwesenheit von Mg^{++} erhöht den Stimulationseffekt.

Die CO_2 -Produktion von Kontrollansätzen und Proben mit Insulinzusatz, deren intrazellulärer Gehalt von Ca^{++} und Mg^{++} durch eine 15 min Inkubation in erdalkalifreiem Medium verringert wurde, kann ebenfalls durch Ca^{++} und Mg^{++} erhöht werden.

Diese Befunde stimmen mit den Untersuchungen über Transportvorgänge überein, die Gould und Chaudry (1970) an EDTA-behandelten Muskeln durchgeführt haben. Danach soll Ca^{++} für die strukturelle Integrität der Membran und der damit verbundenen basalen Glukoseaufnahme irgendwie verantwortlich sein. Mg^{++} dagegen soll für die Insulinstimulierung über die basale CO_2 -Produktion erforderlich sein.

Ein entscheidender Unterschied besteht zwischen der Insulin- und Äscinwirkung auf Fettgewebe, das 15 min in erdalkalifreiem Medium inkubiert war. Während durch Insulin die CO_2 -Produktion auch ohne weitere Ionenzusätze

und Ca^{++} - und Mg^{++} -Zusätze sein Stimulationsvermögen noch weiter erhöhen, ist die Äscinstimulierung in diesem Fall auf zugesetztes extrazelluläres Ca^{++} angewiesen. Über die Bedeutung der Ca^{++} -Ionen bei der Insulinstimulierung haben Clausen et al. (1974) berichtet. Danach soll die Ursache für die Insulinstimulierung die Erhöhung der Konzentration der intrazellulären freien Ca^{++} -Ionen sein.

Bei einem Vergleich der Befunde von Insulin und Äscin am isolierten Fettgewebe fallen große Gemeinsamkeiten auf: Beide Substanzen stimulieren die Aufnahme von Glycin und Leucin, den Transport von Glukose und hemmen die Lipolyse. Auf Grund kinetischer Erwägungen beim Glukosetransport, ihrem gleichen Verhalten gegenüber 3-O-Methylglukose, ihrem nichtadditiven Stimulationsvermögen und der Reversibilität ihres Stimulationseffektes könnte man erwarten, daß Insulin und Äscin in stimulierender Konzentration an der Membran primär die gleichen Rezeptoren ansprechen und das gleiche Carriersystem beeinflussen können.

Unterschiede zeigen Äscin und Insulin in ihrer Wirkung auf die CO_2 -Produktion aus Leucin, auf spezifische Hemmstoffe und in ihrer Sensibilität 2-wertigen Ionen gegenüber. Hierbei scheint Ca^{++} eine wichtige Rolle zu spielen. Möglicherweise können durch Insulin und Äscin unterschiedliche Oberflächenbestandteile freigesetzt werden.

II. Yoshida-Ascitestumorzellen

Die elektronenoptischen Bilder (Abb. 24, 25) machen deutlich, daß der primäre Angriffspunkt von Äscin die Zellmembran der Tumorzellen ist und daß erst bei erheblicher Zellschädigung intrazelluläre Veränderungen wie Vakuolen auftreten. Der Verlust der Mikrovilli läßt beträchtliche Änderungen aller jener Eigenschaften erwarten, die an die Membran gebunden sind.

Anders geartete Membranveränderungen als Folge von Saponinwirkung fanden Seaman et al. (1973). Bei der 15 min Einwirkung von Holothurin A auf Erythrocyten wurden in der Membran schmale, tiefe Einbuchtungen sichtbar, für die herausgelöstes Cholesterin verantwortlich sein soll.

Mit Hilfe des Phasenkontrastmikroskops wurde von Siering (1962a, 1962b) das Phänomen beobachtet, daß die Einwirkung von Äscin auf E.A.T.Z. innerhalb der ersten 15 sec zu einer Verkleinerung des Zellvolumens führte, die sich nach 30 sec wieder ausglich, und dann zu der bekannten Schwellung der Zelle führte. Siering deutete die Änderung des Zellvolumens mit einem schnellen Austritt von K^+ und einem nachfolgenden langsamen Einstrom von Na^+ und Ca^{++} .

Aminosäuren werden analog zum Fettgewebe auch von A.T.Z. angereichert (Christensen und Riggs, 1952). Innerhalb weniger Minuten kommt es zur Sättigung. Äscin hemmt in Konzentrationen ab $3 \times 10^{-5}M$ diesen Transport; kleinere Konzentrationen wirken im Gegensatz zu den Verhältnissen beim Fettgewebe nicht stimulierend. Diese Tatsache steht im Einklang mit Beobachtungen von Graff und McCarthy (1958), wonach auch Insulin bei Tumorzellen keine Stimulierung des Transport auslösen kann. Der Tumorzellenmembran scheinen Insulin-empfindliche Rezeptoren und ein Insulin-empfindliches Carriersystem zu fehlen, worauf auch Äscin analog den Verhältnissen am Fettgewebe einwirken könnte.

Ebenfalls nur hemmende Wirkung zeigen die beiden Isomere

α -Äscin und β -Äscin. Äscinol und Äscigenin bleiben wegen ihrer geringen Wasserlöslichkeit unberücksichtigt.

Die Hemmung des Aminosäuretransports muß beinahe unmittelbar nach Äscinzusatz einsetzen, wie sich aus deutlichen Unterschieden gegenüber Kontrollwerten nach nur 1 - 2 min erkennen läßt. Der Hemmeffekt kann aber wie die vorangegangenen Versuche gezeigt haben, nicht als die Folge begrenzter Lebensfähigkeit angesehen werden. Die Dosis-Wirkungskurve verläuft steil (Abb. 28). Innerhalb einer geringen Konzentrationsbreite liegt der gesamte Hemmbereich. Die negative Beeinflussung erstreckt sich auf das A-(Glycin, α -AiB) und das L-Transportsystem. Offensichtlich hemmt Äscin den aktiven Transport wie die erleichterte Diffusion von Aminosäuren.

Der primäre Angriffspunkt von Äscin scheint die Membranoberfläche zu sein. Im weiteren Verlauf könnte durch Ionenflüsse das Membranpotential verändert werden oder im Zellinnern die Bildung der benötigten Energie verhindert werden, was die beobachtete Transporthemmung zur Folge haben könnte.

Durch zahlreiche Berichte sind eine große Anzahl von Substanzen und Inkubationsbedingungen bekannt, die wie Äscin den Aminosäuretransport herabsetzen. So führten die Inkubation bei 0°C, die Abnahme des O₂-Gehaltes im Medium, die Stoffwechselgifte 2,4Dinitrophenol, Azide, Cyanide und Jodacetat (Heinz, 1957; Kaback, 1968), die Antibiotika Puromycin (Adamson, 1966) und Antinomycin D (Holden et al., 1967) und Dimethylsulfoxid (Hagemann, 1968) zur erheblichen Beeinträchtigung des Aminosäuretransports. Stimulierende Effekte zeigten nur wenige Substanzen wie Pyridoxal und Pyridoxal-5-Phosphat (Riggs et al., 1958).

Die Wirkungsweise der einzelnen Hemmstoffe setzt an verschiedenen Stellen an. Ein Vergleich mit Äscin ist deshalb nicht möglich.

Wie für die Aminosäuren ergibt sich in ähnlicher Weise auch für die Glukose durch Äscin eine negative Beein-

flussung des Transports und des Metabolismus. Stimulierende Effekte ließen sich allenfalls höchst begrenzt erzielen. Die Glukoseabnahme im Medium wird durch Äscin eingeschränkt (Abb. 32), d.h. daß Äscin das Transportsystem der erleichterten Diffusion behindert. Die $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung aus $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glukose wird ebenfalls vermindert (Abb. 33). Dies entspricht in erster Linie einer Hemmung des Pentosephosphatwegs. Meßbare Unterschiede der Hemmwirkung von Äscin auf den Glukosetransport und die CO_2 -Bildung aber ließen sich erst nach einigen Minuten (ca. 5 min) feststellen. Hein (1971) berichtete von einer Herabsetzung der Lactatproduktion aus $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glukose und der $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung aus (U)- ^{14}C -Glukose. Zum einen könnten diese Befunde die Hemmung der Glykolyse und der oxidativen Decarboxylierung beinhalten, zum anderen könnten sie ein indirekter Hinweis auf eine Störung der Atmung sein. Daß der verminderte Stoffwechsel nicht nur eine direkte Folge der Transporthemmung ist, zeigte die Verringerung der intrazellulären Lactatkonzentration ohne extrazelluläre Glukose (Hein, 1971). Daraus folgt schließlich, daß auch der Abbau von endogenen Substraten, wie Aminosäuren und Fettsäuren eingeschränkt wird.

Äscin ($3 \times 10^{-5}\text{M}$) zeigt also eine Behinderung der Glukosepermeation und des Glukoseabbaus. Eine derartige breitgefächerte Wirkung wird nur verständlich, wenn man eine Reihe von möglicherweise hintereinander geschalteten Äscineffekten annimmt. Eine andere Möglichkeit bestünde darin, daß Äscin ein Startsignal auslöst, das dann unabhängig von der weiteren Äscinanwesenheit für alle anderen Hemmeffekte verantwortlich ist.

Die Messung der Atmung durch den O_2 -Verbrauch zeigte nach Äscineinwirkung ein unerwartetes Bild (Abb. 34). Die nach ca. 5 min herabgesetzte $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung aus (U)- ^{14}C -Glukose schien indirekt auf eine Atmungsstörung hinzuweisen. Der O_2 -Verbrauch dagegen wird aber erst 15 min nach Äscingabe eingeschränkt. Zu diesem Zeitpunkt ist die Lebens-

fähigkeit der Zellen bereits stark (60 - 80 % tote Zellen) beeinträchtigt. Das Auftreten der Atmungshemmung durch Äscin scheint daher allein durch den Zelltod verursacht zu sein.

Analog zu den Befunden von Siering an E.A.T.Z. in der Ascitesflüssigkeit in vitro und Würker bei Ratten in vivo beeinflusst Äscin auch den Ionentransfer durch die Plasmamembran von Y.A.T.Z. Während aber Äscin in vivo vorwiegend die extrazelluläre Na^+ -Konzentration erhöht und in vitro in der Ascitesflüssigkeit die Na^+ - und Ca^{++} -Konzentration vermindert, ändert sich durch Äscin der extrazelluläre Na^+ -Gehalt einer Zellsuspension von Y.A.T.Z. im Ringerphosphatmedium nicht. Nur in Medien geringerer Ionenstärke (Saccharose- und Mannitlösung ohne Ionenzusätze) verursacht Äscin eine sprunghafte Erhöhung der extrazellulären Na^+ -Konzentration. Der Zusatz von Na^+ zu diesen Zellsuspensionen hebt die Äscinwirkung auf den Na^+ -Flux wieder auf.

Der K^+ -Gehalt von Zellen in physiologischer Kochsalzlösung oder in Saccharose- bzw. Mannitmedium ohne Ionenzusätze bleibt durch Äscin unbeeinflusst. In (auch K^+ -freiem) Ringerphosphatmedium und in Mannitlösung mit Ionenzusätzen (Na^+ , K^+ , Ca^{++}) veranlaßt Äscin jedoch den Ausstrom von intrazellulärem K^+ beträchtlich. Nach 6 - 8 min scheint der K^+ -Nettoefflux abgeschlossen. Offensichtlich hat sich ein neues Gleichgewicht gebildet. Interessant ist es, daß der Zeitpunkt 6 - 8 min nach Äscinzusatz, an dem der K^+ -Nettoefflux zum Stillstand kommt, auch der Zeitpunkt ist, an dem der Glukoseverbrauch zum Erliegen kommt. Wie weit die Verarmung an intrazellulärem K^+ aber die Hemmung der Glukoseinkorporation zur Folge hat, läßt sich nicht mit Sicherheit festlegen. Gegen die Möglichkeit, daß der K^+ -Efflux die einzige, direkte Ursache für die Glukosehemmung ist, spricht die Hemmung des Glukoseverbrauchs in physiologischer Kochsalzlösung ohne die

gleichzeitige Erhöhung des K^+ -Ausstroms.

Durch Äscin sank die extrazelluläre Ca^{++} -Konzentration einer Zellsuspension im Mannitmedium (Na^+ -, K^+ - und Ca^{++} -Zusatz) beträchtlich herab. Der steilste Abfall war im Bereich von 5 min zu beobachten.

Es stellt sich die Frage, wo das aus dem Medium verschwundene Ca^{++} verbleibt. Dabei kommen 2 Möglichkeiten in Betracht:

Zum einen könnte Ca^{++} durch die Äscineinwirkung in erhöhter Menge in die Zelle gelangen. Im Zellinnern würde das eingeströmte Ca^{++} dann sehr schnell von den Mitochondrien oder vom endoplasmatischen Retikulum als einer Art Puffersystem abgefangen werden (Hasselbach et al., 1970). Auf diese Weise würde die intrazelluläre freie Ca^{++} -Konzentration nach kurzzeitigem Anstieg wieder auf den ursprünglichen niedrigen Wert absinken.

Zum anderen könnte die Äscineinwirkung die Konformation der Membranoberfläche so verändern, daß eine größere Anzahl freier Bindungsstellen für Ca^{++} zur Verfügung stünde. Als Ca^{++} -Rezeptoren an der Membranoberfläche kommen vor allem die sauren Phospholipide in Frage (Dawson und Hauser, 1970).

Da Ca^{++} mit Na^+ um den Zelleintritt konkurriert (Baker, 1970; Rubin, 1974), ist leicht einzusehen, daß Äscin vor allem in ionenarmen Medien (Mannitlösung je 10 mM Na^+ , K^+ , Ca^{++}) die Ca^{++} -Aufnahme in die Zelle besonders fördert. Als Folge einer erhöhten Ca^{++} -Anlagerung an die Membran könnte es zu einer vorübergehenden Stabilisierung der Membran und der Zelle gegenüber weiteren Äscinschädigungen kommen, was die Verringerung der Äscinhemmung erklären könnte. Ohne eine Konformationsänderung wäre es jedoch schwer zu verstehen, daß Ca^{++} in Konzentrationen von 3 - 5 mM den Transport z. B. von Aminosäuren durch die Zellmembran hemmt, in derselben Konzentration aber auch die Äscinhemmung herabsetzt.

Die Einwirkung von EDTA, die sowohl die intrazelluläre

Ca^{++} -Konzentration als auch den membrangebundenen Ca^{++} -Gehalt verringern kann (Gingell, 1970), läßt keinen endgültigen Schluß über den Verbleib der durch Äscin transferierten Ca^{++} -Ionen zu. Allerdings läßt die Tatsache, daß EDTA-vorbehandelte Zellen auch nach Zugabe von Ca^{++} immer noch eine gewisse Hemmung des Aminosäuren-transportes aufweisen, vermuten, daß die EDTA-Behandlung der Zellen neben dem Ca^{++} -Verlust auch eine Änderung der Membranoberfläche bewirkt. Entsprechend könnte eine Konformationsänderung der Membran durch Äscin auch eine Änderung der Ca^{++} -Konzentration, in diesem Fall eine Erhöhung des Membran- Ca^{++} -Gehaltes zur Folge haben. Bei der Konformationsänderung könnten die sauren Phospholipide eine Rolle spielen.

Zum Vergleich und zur näheren Charakterisierung der Äscinwirkung auf die Ionenbewegung durch die Plasmamembran wurden Suspensionen von Y.A.T.Z. mit den Hydrolasen Neuraminidase und Phospholipase D vorbehandelt oder mit der spezifischen Oberflächenkopplungskomponente Con A in 1-wertiger Form oder mit dem Ionencarrier Valinomycin versetzt.

Die Wirkung der einzelnen so unterschiedlichen Stoffe ist erwartungsgemäß verschieden. So erhält man während der Vorinkubation mit Neuraminidase und Phospholipase D analog der Äscinwirkung einen Anstieg des K^{+} -Austritts. Nach 1 x Auswaschen bleibt die K^{+} -Bilanz während des Glukoseverbrauchs in der Hauptinkubation ausgeglichen.

Con A (trypsiniert) und Valinomycin verändern den K^{+} -Gehalt des Mannitmediums nicht merklich, beeinflussen jedoch den Na^{+} - und Ca^{++} -Flux. Und zwar erhöht sich durch Valinomycin der Na^{+} - und Ca^{++} -Einstrom in die Zelle, während bei Con A der Ca^{++} -Influx von einem Na^{+} -Efflux begleitet wird.

Dieser unterschiedlichen Beeinflussung der Na^{+} -, K^{+} - und Ca^{++} -Ströme durch Neuraminidase, Phospholipase D, tryp-

sinisiertes Con A und Valinomycin steht eine einheitliche Erhöhung des Glukoseverbrauchs gegenüber. Daraus läßt sich ableiten, daß - so wichtig auch eine gewisse Mindestmenge an extrazellulärem Na^+ für den Glukosetransport erforderlich sein mag - die z. T. gegensätzliche Beeinflussung des Na^+ -transfers nicht die Ursache der Transportveränderungen sein kann.

Ohne entscheidenden Einfluß auf den Glukoseverbrauch muß auch der extrazelluläre K^+ -Gehalt des Mediums sein, da er durch Valinomycin und Trypsin nicht verändert wird. Nicht auszuschließen ist aber die Möglichkeit, daß eine gewisse Menge intrazellulären K^+ den ungestörten Transport gewährleistet und daß die Erniedrigung des intrazellulären K^+ -Gehaltes durch Äscin u. a. eine Ursache der Äscin-schädigung ist.

Eine ausschlaggebende, vielleicht aber indirekte Rolle beim ungestörten Transport von Glukose und Aminosäuren in die Zelle scheint die zelluläre (membrangebundene oder intrazelluläre) Ca^{++} -Konzentration zu spielen. Denn sowohl Ca^{++} -Mangel (als Ergebnis einer EDTA-Behandlung, die gleichzeitig eine Konformationsänderung der Membran verursachen kann) als auch Ca^{++} -Überschuß (und als Folge eine vermehrte Anlagerung an die negativ geladenen Membranstellen, wodurch es zu einer sterischen Behinderung der Transportrezeptoren kommen kann) lösten beim Transport Hemmvorgänge aus.

Auch für den erhöhten Glukoseverbrauch bei Y.A.T.Z. durch Con A und Valinomycin scheint die intrazelluläre Ca^{++} -Konzentration verantwortlich zu sein. Der Wert hierfür war nach Zusatz der beiden Substanzen angestiegen, was ebenfalls mit einer Änderung der Konformation bzw. Permeabilität in Zusammenhang stehen könnte.

Die Messung der Ionenkonzentrationen von Zellsuspensionen hat gezeigt, daß Äscin Nettoionenflüsse erzeugt und dadurch eine Störung der Ionengradienten im Ruhezustand längs der Plasmamembran verursacht. Interessant ist nun die Frage, ob die Ionenflüsse, der Influx und der Efflux

sich kompensieren, sodaß die intrazelluläre Gesamtionenkonzentration unverändert bleibt oder ob durch einseitige Ströme die intrazelluläre Gesamtionenanzahl verändert wird.

Zur Bestimmung der jeweiligen aktuellen Ionenstärke, der Summe aller vorhandenen Ionen wurden Leitfähigkeitsmessungen durchgeführt. Um bei dieser Methode Unterschiede während der Äscineinwirkung festzustellen, konnten jedoch nur Zellsuspensionen geringer Ionenstärke (z. B. 14 ml Saccharoselösung + 1 ml Y.A.T.Z. im Ringerphosphatmedium) untersucht werden. Dem stetigen leichten Anstieg der Leitfähigkeit bei Kontrollzellen stand bei Äscin-behandelten Zellen ein beschleunigter Anstieg gegenüber. Analoge Ergebnisse bei der Bestimmung der K^+ -Konzentration legen den Schluß nahe, daß der K^+ -Nettoefflux den Ca^{++} -Nettoinflux bei weitem überwiegt. Der Verlust von zellulärem K^+ führt zu einer Erniedrigung des Membranpotentials, das auf einer asymmetrischen Ionenverteilung beruht. Als Folgen lassen sich u. a. irreversible Störungen der Na^+ -, K^+ -Pumpe, der Membranpermeabilität und des Transports erwarten.

Die schnelle Anlagerung von Äscin an die Yoshida-Tumorzellen ist auf den hydrophilen und hydroben Charakter der Äscinmolekel zurückzuführen. Nach Vogel und Marek (1962) bindet sich Äscin in einem stöchiometrischen Verhältnis an Albumin, und nur bei Abwesenheit von Protein bildet sich auch eine sehr viel schwächere Bindung an Cholesterin aus. Auch bei Y.A.T.Z. ist zu erwarten, daß sich Äscin vorwiegend an die Proteinbestandteile der Membran anlagert. Die Tatsache, daß nach dem Lösen der Zellen in NaOH, anschließend dem kurzen Erhitzen oder der Zugabe von $HClO_4$ sich der größte Teil des radioaktiv markierten Äscins nicht im gefällten Material sondern im Überstand befindet, läßt erkennen, daß die ursprüngliche Äscin-Proteinbindung, soweit es sich noch um unverändertes Äscin handelt, gelöst wurde.

Der Proteingehalt desjenigen Materials, das im Zellüberstand mit HClO_4 gefällt wurde, war von der Zeit der Äscinanlagerung unabhängig (Abb. 54). Berücksichtigt man ferner das Ergebnis, daß der radioaktive Gehalt dieses Materials mit der Einwirkungsdauer von Äscin abnimmt, könnte man für den Beginn der Äscinwirkung folgendes Modell aufstellen (wobei die veränderten Ionenströme unberücksichtigt bleiben): Nach der Bindung von Äscin an bestimmte proteinhaltige Membranbezirke kommt es zu einer denkbaren Änderung der Membranoberfläche und zur Freisetzung von Material, das durch Äscin markiert ist und das aus Membranrezeptoren für Äscin bestehen könnte. Im Laufe der fortgesetzten Inkubation wird von den geschädigten Zellen weiteres Material abgegeben, das zwar proteinhaltig, aber nicht mehr ^3H -Äscin-markiert ist.

Die Untersuchung über die Wiederablösung von Äscin in einer Nachinkubation zeigt, daß ein Teil des ^3H -Äscin-markierten Materials bereits während der Anlagerungszeit und durch das Waschen leicht abgespalten wird. Ein kleiner Rest dagegen bleibt auch im Zeitraum einer 30 min Inkubation bei 37°C fest an die Membran gebunden.

Die Titration von Äscin-behandelten Y.A.T.Z. mit einer Säure bzw. Base fügt dem mosaikähnlichen Bild der Äscinwirkung einen weiteren Baustein hinzu. Aus dem Bedarf einer größeren Menge an Titrierlösung (Abb. 47) läßt sich folgern, daß die Pufferkapazität der Äscin-behandelten Zellen sowohl im sauren als auch im alkalischen Bereich zugenommen hat. Durch Äscin scheint die Membranoberfläche so verändert, daß eine größere Zahl von sauren bzw. alkalischen Gruppen zur Verfügung steht. Dies könnte durch abgelöstes geladenes Material, das weitere Ladungen freilegt, oder durch eine Änderung der Konformation in der Membranstruktur erfolgt sein, wodurch es zu einer Lockerung der Bindungen zwischen den

Membranbestandteilen kommen könnte.

Als ein brauchbares Hilfsmittel zur Feststellung einer möglichen Veränderung an der Membranoberfläche, die durch Äscin verursacht sein könnte, dient die isoelektrische Fokussierung der ganzen Zelle. Die unterschiedliche Lage Äscin-behandelter Zellen im pH-Gradienten läßt 2 Schlüsse zu: Entweder ist die veränderte, stärker saure Nettoladung der Zellen nur auf die Anlagerung des sauren Äscins zurückzuführen - dagegen spricht aber die Tatsache, daß Äscin getrennt von den Zellen in einem eigenen Peak wieder gefunden wird - oder aber die Einwirkung von Äscin bewirkt eine tiefgreifende Veränderung der Zelloberfläche. Die Erhöhung der negativen Ladung der Membranoberfläche durch Äscin könnte auch für eine Erhöhung der Ca^{++} -Anlagerung an die Membran verantwortlich sein.

Neben der Anlagerung von Äscin an die Zellmembran, der Änderung der Oberflächenbeschaffenheit und der Beeinflussung des Transports durch die Plasmamembran spielt die Freisetzung von Oberflächenmaterial in das Medium eine wichtige Rolle in der Wirkungsweise von Äscin. Wie bereits in dem Abschnitt Äscinbindung an die Zellmembran gezeigt wurde, konnte durch Ansäuern mit HClO_4 bzw. Erhitzen des Inkubationsüberstandes freigesetztes, proteinhaltiges Zellmaterial gefällt werden. Der zeitliche Ablauf der Loslösung von Zellmaterial ließ sich durch eine Fluoreszenzmessung mit Fluorophor ANS verfolgen. Die Ermittlung der Fluoreszenz im Überstand von Äscin-behandelten Zellen ergab im Unterschied zu Kontrollzellen eine starke Anreicherung von Zellmaterial. Anders als bei der Transporthemmung von Aminosäuren, die unmittelbar nach Äscinzusatz einsetzte, zeigte sich bei der Abgabe von Zellmaterial mittels der fluorometrischen Bestimmungsmethode ein deutlicher Unterschied, verzögert um ca. 5 Minuten. Nach ungefähr 10 min hat die Frei-

setzung ein Plateau erreicht.

Zu einem analogen Kurvenverlauf führte die gravimetrische Bestimmung des (durch Hitze bzw. HClO_4) gefällten, gefriergetrockneten Materials, das durch Inkubation mit Äscin freigesetzt wurde.

Wie aus den Bindungsversuchen mit Äscin erkennbar, scheint es sich bei diesen freigesetzten Material möglicherweise um diejenigen Membranbestandteile zu handeln, an die Äscin zunächst angelagert wurde. Als Hilfsmittel zur Charakterisierung der losgelösten Membranfragmente diente die Methode der isoelektrischen Fokussierung und der Sephadexsäulengelchromatographie.

Aus den experimentellen Ergebnissen der isoelektrischen Fokussierung in den Tabellen lassen sich folgende hypothetische Zusammenhänge ableiten:

1. Der Absorptionspeak bei pH 4,37 enthält das Material, das zuerst von der Membran abgelöst wird. Ein Vergleich mit dem fraktionierten Überstand der Kontrolle weist ebenfalls auf diese Zeitfolge hin. Der Peak bei 4,37 kommt bei den Auftrennungen mit der isoelektrischen Fokussierung am häufigsten als Hauptpeak vor (10 x 1., 2 x 2., 3 x 3. Peak). In ihm befindet sich das Material, das hauptsächlich durch kurze und schonende Behandlung erhalten wird und das durch Erwärmen z. T. gefällt werden kann. Somit dürfte dieses Spaltprodukt einen größeren Proteinanteil erhalten.
2. Die einzelnen Absorptionspeaks sind nicht unabhängig voneinander, vielmehr entstehen aus dem Material des Peaks pH 4,37 durch weiteres Einwirken von Äscin (Hydrolyse) kleinere Bruchstücke.
Faßt man in einem Schema zusammen, wie häufig einzelne Peaks nebeneinander vorkommen, so erhält man die höchsten Zahlenwerte bei den Peakkombinationen 4,37 und 3,54 (19 Fälle) und 4,37 und 5,47 (16 Fälle von insgesamt 26 Versuchen).

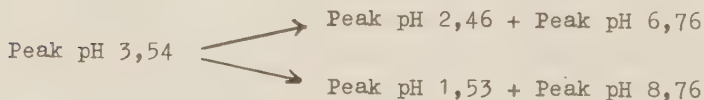
Außerdem tritt der Peak pH 3,54 bei kurzzeitigen Wärmefällungen am häufigsten als Hauptpeak auf (in 3 von 4 Fällen), bei Wärmefällungen bis 2 min in allen 3 Fällen. Auf Grund dieser Beziehungen könnte man als ersten Schritt des Zerfalls eine Disproportionierung des Peakmaterials pH 4,37 in je ein Spaltprodukt $pI < 4,37$ und $pI > 4,37$ annehmen.

Für die Wahrscheinlichkeit, daß der 1. Schritt so wie oben angegeben verläuft, läßt sich außerdem anführen, daß, falls der Hauptpeak bei pH 4,37 liegt, die nächst beiden höheren Peaks offensichtlich Peak pH 1,53 und Peak 3,54 sind (in 4 bzw. 6 von 10 Fällen).

3. Das Schema des gleichzeitigen Auftretens der Peaks kann auch zur Betrachtung des nächsten Zerfallsschrittes herangezogen werden.

- a. Für den Fall, daß der Peak pH 3,54 das Maximum darstellt, sind Peak pH 2,46 und Peak 1,53 am häufigsten (3 x bzw. 2 x) die nächst höheren absorbierenden Peaks.
- b. Falls der Peak pH 2,46 als Maximum auftritt, dann ist der Peak pH 6,76 begünstigt.
- c. Die Häufigkeit des gleichzeitigen Auftretens von Peak pH 3,54 mit Peak pH 6,76 und Peak pH 8,76 beträgt je 12 in 26 Versuchen.

Aus den Punkten a, b und c könnte sich als 2. Zerfallsschritt ergeben:



4. Durch die Dialyse wird die größte Menge des ^3H -Äscinmarkierten Materials ($> 95\%$) entfernt. Da die Tiglinsäure die Tritium-Markierung trägt (Henschler et al.,

1971), muß diese oder das gesamte Äscinmolekül dialysabel sein, d. h. frei oder nur schwach gebunden sein. Daneben erfährt der restliche ^3H -markierte Anteil eine Verschiebung im pH-Gradienten nach pH 5,70. Der Grund hierfür könnte entweder in einer Veränderung des Äscins in Folge der Hydrolyse von sauren Gruppen liegen, oder könnte die Folge einer starken Bildung des Äscins sein, durch welche die teilweise Neutralisierung der sauren Äscingruppe erfolgt.

Es hat den Anschein, daß durch längere Äscineinwirkung und durch Erhitzen das erste Spaltprodukt hydrolysiert wird. Als Folge der Hydrolyse verändert sich die Größe und die Lage der Absorptionspeaks und zwar scheint das abgelöste Material in verschiedene Bruchstücke unterschiedlicher Ladung zu disproportionieren. Mit der Dauer der Einwirkung wächst die Menge an stark saurer und basischer Substanz zu Lasten der Peaks bei mittleren pH-Werten.

Untersuchungen über die Funktion der Inkubationsdauer führten wie bei der isoelektrischen Fokussierung auch bei der Säulengelchromatographie zu Spekulationen über den Ablösevorgang von Membranmaterial. In Tabelle 19 ist die Abhängigkeit der Lage des Hauptpeaks von der Inkubationszeit dargestellt und in Tabelle 20 der Einfluß der Inkubationsdauer auf das Erscheinen eines Peaks. Bei der Inkubationszeit von 7 min dominiert ein Absorptionspeak mit dem Maximum bei der Fraktionsnummer 40/44, während bei 15 min ein Peak bei Fraktionsnummer 84/87 zu Lasten desjenigen bei 40/44 anwächst. Das bedeutet, daß der Peak Fr. Nr. 40/44 ursprünglich abgelöstes Material enthält, das dann im weiteren Inkubationsverlauf gespalten wird. Beim Vergleich mit der isoelektrischen Fokussierung sollte das Material vom Peak Fr. Nr. 40/44 dem Material mit den isoelektrischen Punkt von 4,37 ähnlich oder identisch sein.

Tabelle 19:

Abhängigkeit der Lage des Hauptpeaks von der Inkubationszeit

Zahl der Versuche Hauptpeaklage	Inkubationsdauer		Ko-zellen		Äscin-		Trypsin-		Neuraminidase behandelte Zellen
	7'		4		4		4		
			3		4		1(2)		3
Zahl der Versuche	15		2		3		1		-
Lage des Haupt- peaks bei Fr 84-87			2		2		-		-

Tabelle 20:

Abhängigkeit des Auftretens eines Peaks von der Inkubationszeit

7'(15 Tren- nungen)	Fr. Nr.		40-44		46-50		59-63		69-73		77-80		84-87		90-94	
	Anzahl		13		5		5		1		11		5		14	
15'(6 Tren- nungen)	Anzahl		2		2		1		2		1		5		6	

Um eine Vorstellung über Einzelschritte der Hydrolyse zu gewinnen, wurde die Methode der Molekulargewichtsbestimmung als Hilfsmittel herangezogen. Zu diesem Zweck erhielten Stoffe bekannten Molekulargewichts, die über die Sephadexsäule fraktioniert und eindeutig identifiziert wurden, eine bestimmte Fraktionsnummer zugeordnet (^3H -Äscin MG 1140, ^{14}C -Glukose 180). Trägt man nun in ein Diagramm den Logarithmus des Molekulargewichtes als Funktion der Menge des Elutionsvolumens (bzw. der Fraktionsnummer) auf, so erhält man über einen breiten Bereich eine lineare Beziehung (Abb. 59). An Hand dieser gewonnenen Eichgeraden läßt sich das jeweilige Molekulargewicht der unbekannten Hydrolyseprodukte abschätzen (Tabelle 21).

Tabelle 21.: Molekulargewichte der gewonnenen Fraktionsbereiche

Fr. Nr.	40-44	46-50	59-63	69-73
MG	1360-1140	1020-840	540-440	330-270
	(a)	(b)	(d)	
Fr. Nr.	77-80	84-87	90-94	
MG	220-190	160-130	120-60	
	(e)	(f)	(c)(g)	

Auf Grund der erhaltenen Molekulargewichte (Tab. 21) und unter Berücksichtigung der Inkubationsdauer (Tab. 19, Tab. 20) könnte die Hydrolyse über folgende Schritte verlaufen:

1. a b + 2c
2. b 2d
3. d 2e
4. e f + g

Die Schritte 1 - 3 würden vor allem in den ersten Minuten verlaufen (vgl. 7 min Überstände), während bei den 15 min Überständen bereits Schritt 4 eingetreten ist.

Die aus den Daten der isoelektrischen Fokussierung und der Säulengelchromatographie abgeleiteten beiden Hydrolyseschemata stimmen dem Anschein nach nicht überein. Wegen des anders gearteten Trenncharakters der beiden Methoden ist es aber schwer, nähere Zusammenhänge zwischen den fraktionierten Bestandteilen beider Gruppen aufzufinden. Es wäre denkbar, daß Material, das nach der einen Trennart erhalten wurde, bei der anderen Fraktionierungsart unentdeckt bliebe, sei es daß es mit einer anderen Fraktion zusammenfällt, die gleiches Molekulargewicht bzw. gleiche Ladung besitzt, sei es daß der betreffende Bestandteil erst während der Auftrennung in der Säule neu entsteht.

Aus den beiden Trennverfahren läßt sich jedoch eine gemeinsame Schlußfolgerung ziehen: Die Freisetzung von Zellmaterial durch Äscin erfolgt durch die Abgabe einer primären Substanz, die dann durch Hydrolyse in mehrere Bruchstücke zerfällt.

Die chemische Analyse des abgelösten, mittels Gelchromatographie aufgetrennten Zellmaterials lieferte ein qualitativ ähnliches Bild unabhängig davon, ob die Zellen in einer 7 min Inkubation ohne Zusätze nur im Ringerphosphatmedium behandelt wurden oder ob Reagenzien wie Äscin, Trypsin und Neuraminidase einwirkten (Tabelle 22).⁺⁾ In den einzelnen Fraktionsbereichen zeigten sich je nach der Art des Überstandes zwar Abweichungen in der Menge des abgelösten Materials und im prozentualen Gehalt an Protein, Zucker und Sialinsäure, jedoch fanden sich nach einer 7 min Inkubation keine spezifischen Unterschiede. Der Zellbestandteil mit Peakmaximum 40/44 wies einen Proteingehalt von 35 - 55 % und einen Zuckergehalt von ca. 7 % auf. Das Material, das nach dem entwickelten

⁺⁾ siehe Anhang

Zerfallsschema zuerst freigesetzt wird, hat demnach Glykoproteincharakter. Dieser Befund unterstützt die Hypothese, wonach Äscin auf Grund seiner starken Affinität sich an Proteine der Membranoberfläche anlagert und wonach diese dann aus dem Membrankomplex freigesetzt werden (vgl. Abb. 54).

Einen höchst interessanten Befund ergab die Messung der Radioaktivität zur Bestimmung der Lage von ^3H -Äscin (Abb. 56). Die Tritiummarkierung fand sich beinahe ausschließlich im Fraktionsbereich 90/94. Entsprechend der Eichgeraden (Abb. 59, Molekulargewicht als Funktion der Fraktionsnummer) aber sollten in diesem Bezirk Stoffe mit einem Molekulargewicht von etwa 100 liegen. Da die ^3H -Radioaktivität des Äscins an der Doppelbindung der Tiglinsäure (MG 102) fixiert ist, müßte demnach die Säure während der 15 min Inkubation durch die Einwirkung auf die Zellen bzw. durch die Spaltungsaktivität der Zellen von dem Triterpengerüst abgelöst worden sein.

Die Annahme einer möglichen Hydrolyse von Äscin während der Inkubation mit Zellen führt zu der Frage nach dem Verbleib des restlichen Moleküls. Wegen der geringen Ausgangsmenge von Äscin ($30\text{ }\mu\text{M}$) läßt sich dieser Sachverhalt aber nicht ohne weiteres klären. In diesem Zusammenhang wäre es von Vorteil zu wissen, ob bei den Anlagerungsversuchen mit Äscin mit fortschreiten der Inkubationsdauer nur die radioaktiv markierte Tiglinsäure freigesetzt wird und das restliche Saponin an der Membran gebunden bleibt oder ob auch dieser Anteil möglicherweise zusammen mit Zellmaterial ins Medium abgegeben wird.

Die leichte Freisetzung von Fucose-haltigem Zellmaterial, wie sie bereits bei den Kontrollzellen erkennbar ist (Abb. 60), deckt sich mit Beobachtungen von Hartmann et al. (1972). Danach haben transformierte Zellen einen geringeren Zuckergehalt an der Membranoberfläche als die nicht transformierten Ausgangszellen. Der Grund hierfür

liegt in der besonderen Fähigkeit der transformierten Zellen, Oberflächenmaterial vermehrt in das umgebende Medium abzuscheiden. Die Summe der Kohlenhydratmenge von Zelloberfläche und Waschmedium jedoch ist für transformierte und nicht transformierte Zellen gleich groß.

Yoshida-Asciteszellen zeigten erwartungsgemäß hinsichtlich der Abgaberate von Oberflächenmaterial eine große Ähnlichkeit mit transformierten Zellen. Durch Äscin wurde die Freisetzung noch erheblich gesteigert.

Die isoelektrische Fokussierung (Abb. 64) ergab, daß der Fucose-markierte Anteil nicht deckungsgleich mit irgendwelchem Material ist, das Absorptionsvermögen besitzt, d. h. daß dieser Bestandteil unabhängig von dem bereits besprochenen freigesetzten Material auftritt und möglicherweise spezifisch für Fucose-behandelte Zellen ist. Neben dem Fucosepeak ließ sich eine geringe Menge der ^{14}C -Fucose-Radioaktivität ermitteln, die über die ganze Säule verteilt war und zwar kontinuierlich anwachsend mit steigendem pH. Diese Radioaktivität dürfte von unveränderter Fucose stammen, wie die Elektrofokussierung der beiden Substanzen ^3H -Äscin und ^{14}C -Fucose zeigt (Abb. 67). Der Anstieg des Fucosegehaltes ist auf die Füllung der Säule durch den Gradientenmischer zurückzuführen und nicht auf eine Wanderung der ladungsfreien Fucose.

Vergleicht man die Größe der beiden Fucosepeaks von Kontroll- und Äscin-behandelten Zellen, in dem man die Zahlen der Dpm-Werte unter dem jeweiligen Peak addiert und davon den Untergrund abzieht, so zeigt sich, daß Äscin aus Fucose-behandelten Zellen in der 15 min Inkubation ca. 4,5 x soviel Fucose-haltiges Material abspaltet, das auf Grund seiner Ladung verstoffwechselte Fucose in irgend einer Form enthalten muß. Die Molekülgröße dieses Oberflächenbestandteils liegt unter 1000,

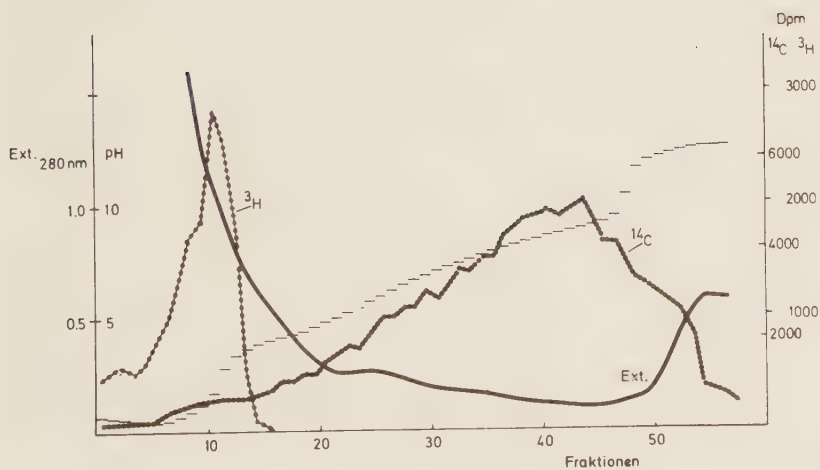


Abb. 67: Isoelektrische Fokussierung von ^3H -Äscin und $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Fucose

da die Dialyse der Einzelfractionen nach der Elektrofokussierung alles Fucose-haltige Material und die Dialyse des Ausgangsmaterials vor der Elektrofokussierung nahezu das gesamte Fucose-haltige Material ($> 90\%$) entfernte (Abb. 61). Die Dialyse verursachte, wie auch für den Äscinpeak festgestellt wurde, eine Lageveränderung im pH-Gradienten. Das ^{14}C -markierte Material lag bei dem noch kleineren pH-Wert $0,82 \pm 0,06$, was wiederum die Aufspaltung des ursprünglich freigesetzten Materials oder die Anlagerung von saueren Bestandteilen an den ursprünglichen Fucose-haltigen Bestandteil bedeutete.

Aus der Eichgeraden Abb. 59 (Molekulargewicht als Funktion der Fraktionsnummer) läßt sich für die 4 Peaks ein ungefähres Molekulargewicht ermitteln. Auf Grund dieser Werte, der Ladung und der Befunde von Ishihara (1968) über den Fucosestoffwechsel lassen sich Spekulationen über die einzelnen Fucose-haltigen Substanzen anstellen. Im Bereich 81/84 dürfte unveränderte Fucose vorliegen, in den Fraktionen 58/61 GDP-Fucose, und im Bereich 91/94 ein Abbauprodukt möglicherweise Lactaldehyd.

Die Dauer der Vorinkubation mit Fucose (30 - 60 min) ergibt bei den hier angegebenen Versuchsbedingungen keine Verschiebung zu Gunsten eines bestimmten, sauren Produkts. Jedoch zeigt sich, daß nur Äscin-behandelte Zellen im Gegensatz zu Kontrollzellen und Neuraminidase-behandelten Zellen das höher molekulare Produkt GDP-Fucose freisetzen. Aus der isoelektrischen Fokussierung und der Trennung über Sephadex läßt sich folgern, daß die freigesetzten Fucose-markierten Produkte erst Vorstufen von Membranmaterial darstellen und nicht von der Oberfläche, sondern aus dem Zellinneren stammt. Da Äscin praktisch die gesamte Radioaktivität der Fucose innerhalb weniger Minuten aus der Zelle herauslöst, das Fucose-markierte Produkt offensichtlich aber aus dem Zellinneren stammt, läßt sich Fucose für Y.A.T.Z. unter den angegebenen Versuchs-

bedingungen innerhalb von 60 min nicht ohne weiteres als Membranmarkierungssubstanz verwenden.

Y.A.T.Z., die nur kurzfristig (bis 7 min) mit Äscin, Trypsin und Neuraminidase vorbehandelt waren, zeigten keine Einschränkung ihres Glukoseverbrauchs. Die Trypsinvorbehandlung schien den Verbrauch sogar geringfügig zu erhöhen. Der Gehalt an Radioaktivität in den Zellen stieg durch die ^{14}C -Glukoseaufnahme schnell an, verringerte sich aber bereits nach 10 min durch Abgabe von radioaktiven Abbauprodukten.

Im Medium ^{14}C -Fucose-vorbehandelter Zellen wird der Gehalt an Radioaktivität durch 3 z. T. gegenläufige Bewegungen bestimmt (Abb. 63). Bei Kontrollzellen und Trypsin- bzw. Neuraminidase-behandelten Zellen macht sich zunächst (bis 30 min) durch den schnellen Glukosetransfer in die Zellen ein starker Abfall der Radioaktivität im Medium bemerkbar. Im weiteren Verlauf tritt die langsame Abgabe von ^{14}C -Fucose-haltigem Material und ^{14}C -Stoffwechselprodukten (z. B. $^{14}\text{CO}_2$), die aus der $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glukose gebildet wurden, in das Medium in den Vordergrund. Es kommt wiederum zum Anstieg der Radioaktivität im Medium. Bei Äscin-vorbehandelten Zellen ($3 \times 10^{-5}\text{M}$, 7 min) ergibt die schnelle Freisetzung des noch vorhandenen Fucose-haltigen Materials zunächst einen Anstieg der Radioaktivität im Medium und dann durch den Glukosetransfer in die Zellen einen langsamen Abfall.

Entsprechend läßt sich der zeitliche Verlauf der Radioaktivität in demjenigen Material erklären, das in der 15 min Nachinkubation von den Zellen abgelöst wurde (Abb. 64). Bei 30 min wird ein Maximum durchschritten, das bei Kontrollzellen und Neuraminidase-behandelten Zellen wegen des größeren verbliebenen Fucosegehaltes höher liegt als bei Äscin- bzw. Trypsin-behandelten Zellen. Nach 30 min verlieren die Zellen zunehmend Radioaktivität an das Medium. Der Gehalt an ^{14}C in den Zellen fällt und damit

die Menge an Radioaktivität, die in der Nachinkubation freigesetzt werden kann.

Nimmt man an, daß es sich bei den durch Trypsin in den 15 min Nachinkubation freigesetzten Substanzen um neugebildetes Material handelt, müßte ein wichtiges Kriterium erfüllt sein, und zwar müßte in diesem Fall das durch Trypsin abgelöste Produkt eine hohe Ähnlichkeit mit jenem Material aufweisen, das während der 7 min Inkubation durch Trypsin, Neuraminidase oder Äscin abgelöst und über eine Gelchromatographiesäule (Sephadex G25 fine) fraktioniert wurde (Vgl. Abb. 57 und Abb. 58). Im einzelnen vermittelt die Säulenauftrennung des Mediums (15 min Nachinkubation mit Trypsinzusatz) folgendes Bild: Der Proteingehalt des freigesetzten Materials erfährt in allen 4 Gruppen (Kontroll-, Äscin-, Trypsin-, Neuraminidase-behandelte Zellen) einen etwa gleichgroßen steilen Anstieg, der bei 30 - 60 min das Maximum erreicht und anschließend eine langsam fallende Abnahme. Da durch die 15 min Trypsineinwirkung in allen 4 Gruppen (auch bei Kontrollzellen) etwa gleichviel proteinhaltiges Material losgelöst wird, ist es wahrscheinlicher, daß es sich bei diesem abgelösten proteinhaltigen Material um keine Neubildung handelt, vielmehr scheint sich in der 3 h Inkubation bei 37 °C bereits während der ersten 30 min proteinhaltiges Material so zu lockern, daß es in der Nachinkubation durch Trypsin leicht freigesetzt wird. Der nachfolgende Abfall erklärt sich dadurch, daß die Zellen an freisetzbarem proteinhaltigem Material verarmen.

Der Zuckergehalt des abgelösten Materials als Funktion der Inkubationszeit weist zwischen unbehandelten Kontrollzellen und (7 min) Äscin-, Trypsin-, Neuraminidase-behandelten Zellen einen deutlichen Unterschied auf (Abb. 65). Während bei Kontrollzellen eine langsame stetige Abnahme zu registrieren ist, durchläuft der Zuckergehalt im freigesetzten Material von behandelten Zellen ein Maximum, das

bei Trypsin-behandelten Zellen besonders ausgeprägt ist. Der Abfall bei den Kontrollzellen läßt sich durch die Abgabe von zuckerhaltigem Material mit fortschreitender Inkubationsdauer erklären, für behandelte Zellen gibt es zwei Möglichkeiten:

Zum einen könnten die Zellen durch die 7 min Inkubation so geschädigt sein, daß während der nachfolgenden 3 h-Inkubation zuckerhaltiges Material bereits in den ersten 30 min beschleunigt freigesetzt wird.

Zum anderen könnte die im Medium vorhandene Glukose durch behandelte Zellen bevorzugt aufgenommen werden, ohne daß damit bereits der Wiederaufbau des während der 7 min Inkubation abgelösten Materials verbunden wäre. Allerdings schließen die Zeitkurven der behandelten Zellen den Wiederaufbau von zuckerhaltigem Material auch nicht aus.

Der Sialinsäuregehalt des abgelösten Materials zeigt wie der Zuckergehalt einen beträchtlichen Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Zellen. Bei den Kontrollzellen wächst mit der Inkubationsdauer die Möglichkeit der Abspaltung. Daraus resultiert ein stetiger Anstieg mit der Zeit. Neuraminidase-behandelte Zellen verhalten sich ähnlich wie Kontrollzellen. In diesem Fall ist aber nach 30 min bereits ein Plateau erreicht, da in der 7 min Inkubation mit Neuraminidase ein ansehnlicher Teil der Sialinsäure freigesetzt wurde. Für den Sialinsäuregehalt Äscin- bzw. Trypsin-behandelter Zellen gelten analoge Möglichkeiten, wie bereits für den Zuckergehalt besprochen wurde.

Wegen des gleichartigen Verlaufs des Proteingehalts im abgelösten Material von behandelten und unbehandelten Zellen läßt sich nicht ohne weiteres entscheiden, ob ein Wiederaufbau des primär losgelösten proteinhaltigen Materials während der 3h-Inkubation erfolgt ist. Die unterschiedlichen Mengen an freigesetztem Zucker- bzw. sialinsäurehaltigem Material könnten aber ein Hinweis auf eine neue

Synthese sein. Die Diskrepanz des unterschiedlichen Verlaufs des Protein- und Sialinsäuregehaltes könnte aber darauf hindeuten, daß das durch Trypsin in 15 min freigesetzte Material nicht einheitlich ist, sondern daß Protein- und Zuckeranteile auch unabhängig voneinander freigesetzt werden können. Ob die Zuckerderivate von der Oberfläche stammen, läßt sich nicht definitiv entscheiden.

Die Inkubation mit Glukosamin (Abb. 66) zeigt den schnellen Verbrauch im Medium und die schnelle Aufnahme in die Zelle. Diese Vorgänge bringen aber ebenfalls keinen Aufschluß darüber, ob die aufgenommene Radioaktivität, die in der Nachinkubation wieder freigesetzt wird, sich im Zellinnern befand oder ob sie zum Wiederaufbau des abgelösten Materials verwendet wurde.

Abschließend läßt sich über den zeitlichen Reaktionsablauf der Äscinwirkung folgendes Schema entwerfen:

Als erstes erfolgt die Anlagerung des Saponins an die Membranoberfläche. Danach kommt es auf Grund von Ionenflüssen durch die Membran zu einer Verringerung des Membranpotentials. Gleichzeitig macht sich die Hemmung des Aminosäuren- und Zuckertransports bemerkbar. Außerdem findet eine Abgabe von Zellmaterial, möglicherweise auch von aktivierten Zuckern statt. Anschließend setzt die Loslösung von Oberflächenfragmenten, glykoproteinhaltigem Material, ein, das in kleinere Bestandteile aufspaltet. Durch die Abgabe von Oberflächenmaterial kommt es zu einer Struktur- bzw. Konformationsänderung der Membran, die sich in einer Erhöhung der negativen Membranladung äußert. Schließlich kommt es zur Atmungsstörung, zum Zelltod und zur Auflösung der Zelle in kleine Bruchstücke.

G. ZUSAMMENFASSUNG

Dem experimentellen Teil wurde eine Übersicht über Theorien der Tumorentstehung, über Unterschiede zwischen Tumorzellen und "normalen" Zellen, über den Aufbau der Plasmamembran und über Eigenschaften des Pharmakons Äscin vorangestellt.

Bei den Untersuchungen am epididymalen Fettgewebe der Ratte im 1. Teil wurde der Vergleich der Wirkungen von Äscin mit den bekannten Eigenschaften von Insulin in den Vordergrund gestellt.

Äscin zeigte je nach Konzentration ein biphasisches Verhalten auf den Transport von Glukose und Aminosäuren. In Konzentrationen über $3 \times 10^{-5} \text{M}$ übte Äscin eine hemmende Wirkung aus, in kleineren erhöhte Äscin ähnlich wie Insulin den Transport von Glukose und Aminosäuren sowie z. T. deren Verstoffwechslung. An Hand von Auswaschversuchen erwies sich auch die Stimulation durch Äscin als reversibel. Eine kinetische Analyse des Glukosetransports nach Lineweaver-Burk ergab eine nicht kompetitive Hemmung. Die Transportkonstanten K_m und die maximalen Geschwindigkeiten $V_{\max}$ wurden für Äscin, α -Äscin und β -Äscin zusammengefaßt.

Bei der Stimulation des Transports durch Äscin und Insulin scheint der Ca^{++} -Gehalt dann eine Rolle zu spielen, wenn die Ca^{++} -Konzentration des Gewebes durch eine Vorbehandlung in erdalkalifreiem Medium mit und ohne EDTA verringert wurde. Möglicherweise ist Ca^{++} für die basale Aufnahme von Glukose und Aminosäuren in das Fettgewebe unumgänglich erforderlich. Äscin scheint wie Insulin die intrazelluläre Ca^{++} -Konzentration zu erhöhen.

Die Stimulierung des Glukosetransports durch Äscin und Insulin wird durch 3-O-Methylglukose in ähnlicher Weise verringert. Äscin und Insulin in optimal stimulierenden Konzentrationen zeigen keine synergistische Wirkung bei der Stimulierung des Transports.

Wie Insulin verminderte auch Äscin das Ausmaß der Lipolyse im Fettgewebe.

Untersuchungen über das Fluoreszenzvermögen des Inkubationsmediums und seine Fraktionierung mittels Säulengelchromatographie ergaben nur geringfügige Unterschiede zwischen Kontrollgewebe und Äscin- und Insulin-behandeltem Gewebe. Äscin scheint jedoch zusätzlich eine geringe Menge einer proteinreichen Substanz aus dem Gewebe freizusetzen.

Der Vergleich der ähnlichen Eigenschaften von Äscin und Insulin führt zu der Vermutung, daß Äscin und Insulin in stimulierenden Konzentrationen die gleichen Rezeptoren an der Membran ansprechen und das gleiche Carriersystem beeinflussen.

Im 2. Teil wurde die Wirkung von Äscin auf Yoshida-Ascitestumorzellen untersucht, die über keine durch Insulin stimulierbaren Transportsysteme verfügen. Äscin wurde vorwiegend in einer Konzentration von $3 \times 10^{-5} \text{ M}$ angewandt.

Mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen konnte bereits im makromolekularen Bereich als Äscinwirkung der Verlust der Mikrovilli an der Membranoberfläche beobachtet werden.

Die Lebensfähigkeit der Zellen ist bei länger andauernden Inkubationszeiten selbst bei nur kurzfristiger Vorbehandlung (1, 4, 7 min) mit Äscin merklich herabgesetzt.

Der Transport von Aminosäuren wird bereits nach 1 - 2 min Äscineinwirkung gehemmt, in dieser kurzen Zeit aber nicht als Folge begrenzter Lebensfähigkeit. Die Hemmung der Aufnahme unterschiedlicher Aminosäuren zeigt den Einfluß von Äscin auf den aktiven Transport und die erleichterte Diffusion.

Der Transfer von Glukose in die Zelle, ein Transportvorgang der erleichterten Diffusion, wird - gegenüber der Aminosäureaufnahme zeitlich etwas verzögert - nach ca. 6 - 8 min eingeschränkt. Zu einem ähnlichen Zeitpunkt tritt auch die Hemmung der CO_2 -Bildung ein. Eine Störung der Atmung, die Abnahme des O_2 -Verbrauchs, zeigt sich nach etwa 15 min, wor die Zellen eine erhebliche Schädigung bis hin zum Zelltod

Äscin kann abhängig von der Zusammensetzung des Inkubationsmediums die Fluxe der wichtigsten Kationen (Na^+ , K^+ und Ca^{++}) beeinflussen. Im Ringerphosphatmedium verursacht Äscin einen beträchtlichen K^+ -Efflux bei gleichzeitigem Ca^{++} -Influx. Ein interessanter Befund zeigte sich bei der Erhöhung der normalen Ca^{++} -Konzentration im Medium von ca. 2 mM auf 3 - 5 mM. Durch diese Erhöhung der Ca^{++} -Konzentration konnte in günstigen Fällen die Hemmung des Transports von Glukose und Aminosäuren nahezu aufgehoben werden. Die zelluläre Ca^{++} -Konzentration, ob membrangebunden oder intrazellulär, scheint bei Transportvorgängen eine entscheidende Rolle zu spielen.

Der K^+ -Nettoausstrom kommt bei einer Äscinkonzentration von $3 \times 10^{-5} \text{M}$ nach 6 - 8 min zum Stillstand. Zu demselben Zeitpunkt erhält man bei Leitfähigkeitsmessungen, einem Meßverfahren zur Bestimmung der jeweiligen aktuellen Ionenstärke, die größte Konzentrationsänderung.

Die Anlagerung von Äscin an Yoshida-Ascitestumorzellen, der 1. Schritt der Äscineinwirkung, erfolgt innerhalb von 1-2 min bereits vollständig. Die Bindung von Äscin an die Zellen führte zu erheblichen Veränderungen der Membranoberfläche, wie sich bei der Titration und der isoelektrischen Fokussierung der Zellen zeigte. Die Titration von Äscin-behandelten Zellen ergab eine größere Pufferkapazität, eine Erhöhung der Zahl der zugänglichen sauren und alkalischen Gruppen. Die isoelektrische Fokussierung der Zellen erbrachte als Äscinwirkung eine Erhöhung der negativen Oberflächenladung der Membran möglicherweise als Folge einer Konformationsänderung der Membran.

Die Äscinanlagerung führte nach 6 - 8 min zu einer beträchtlichen Loslösung von Zellmaterial in das Inkubationsmedium, was sich mittels fluorometrischer und gravimetrischer Bestimmungsmethoden feststellen ließ. Das freigesetzte Zellmaterial wurde mit den Trennverfahren der isoelektrischen Fokussierung und der Säulengelchromatographie fraktioniert und auf den Gehalt an Protein, Zucker und Sialinsäure untersucht. Abhängig von den Inkubationsbedingungen erhält man Unterschiede in den fraktionierten Proben. Die einzelnen

Bestandteile scheinen von Zellmaterial herzurühren, das im Verlauf der Inkubation hydrolysiert wird. Für diesen Zerfallsvorgang des abgelösten Materials wurde ein Schema erörtert.

Mittels der Vorbehandlung mit ^{14}C -Fucose, einem Membranbaustein, wurde versucht, das durch Äscin freigesetzte Oberflächenmaterial zu markieren. In den angegebenen Versuchsbedingungen wurden saure Fucose-markierte Zwischenprodukte gefunden.

Zur Regenerierung von Oberflächenmaterial von Y.A.T.Z., das durch Äscin und zum Vergleich durch Trypsin und Neuramidase abgelöst war, wurde den behandelten Zellen ^{14}C -Glukose und ^{14}C -Glukosamin zugesetzt, um markiertes Oberflächenmaterial neuzubilden. Das nach der Inkubation zur Membranregenerierung durch Trypsin abgelöste Material wurde auf seine Bestandteile untersucht. Es ließ sich aber nicht eindeutig als neugebildetes Membranmaterial charakterisieren.

Zum Schluß wurde ein Schema der vielseitigen Äscinwirkungen erstellt.

H. ANHANG

Tabelle 7

Tabelle 10

Tabelle 13

Tabelle 22

Tabelle 7

Trennung der Inkubationsmedien nach 2 h Inkubation von Fettgewebe über Sephadex G25 fine.
(vgl. Text S. 105)

Fraktionsbereiche :

	1	2	3	4	5
Ko wiederge- fundenes Gewicht (64,9%)		(47-58) 53 Gewichts % 1% KH 1% Pr 13,6%			77 (76-82) 79 (6,2 mg) KH 0,8% Pr 22,0%
Insulin (69,8%)			(56-71) 60 (0,3 mg) 0,2% KH 13,6% Pr (211%)		78 (72-81) (3,6 mg) KH 0,8% Pr 6,6%
Äscin $10^{-4}M$ (60,6%)		(50-59) 56 (1,4 mg) 0,7% KH 2,0% Pr 26,8%		(60-74) 71 (1,7 mg) 0,9% KH 6,8% Pr 17,8%	77 (75-81) (5,9 mg) KH 0,4% Pr 9,0%
Äscin $10^{-6}M$ $8 \times 10^{-6}M$ (69,2%)	(43-51) 45 (0,7 mg) 0,7% KH 5,9% Pr 94,0%				79 (74-83) (5,6 mg) KH 0,7% Pr 5,3%

Erklärung:

z. B.: (47 - 58) 53 = Fraktion 47 - 58 mit Maximum bei Fraktion 53

KH = Kohlenhydrat; Pr = Protein; P = Phosphat

Trennung der Inkubationsmedien nach 2 h Inkubation von Fettgewebe über Sephadex G25 fine.

Fraktionsbereiche :

	6	7	8	9	10
Ko wiederge- fundenes Gewicht (64,9%)	(83-88) 86 (6,7 mg) 7,6% KH 1,5% Pr 11,2%	(84-94) 91 (45,5 mg) 38,9% KH 1,8% Pr 1,9% P 0,2%	(89-97) 93/4 (35,5 mg) 40,3% KH 3,1% Pr 0,2%	(95-98) 97 (2,51 mg) 21,4% KH 0,3% Pr 0,0%	(99-103) 101 (2,2 mg) 1,8% KH 0,9% Pr 0,0%
Insulin (69,8%)	(82-88) 86 (16,0 mg) 8,5% KH 0,6% Pr 5,0%	(89-93) 91 (13,3 mg) 7,1% KH 17,9% Pr 3,3% P 1,7%	(94-98) 94 (83,4 mg) 44,4% KH 0,4% Pr 0,2%		(99-104) 98 (14,6 mg) 7,8% KH 0,4% Pr 0,3% P 0,3%
Äscin 10-4M (60,6%)	(82-86) 84 (13,2 mg) 6,8% KH 1,0% Pr 0,7%	(87-91) 90 (11,2 mg) 5,7% KH 20,4% Pr 1,1% P 1,6%	(92-95) 93 (69,1 mg) 35,2% KH 0,5% Pr 0,0%		(96-101) 98 (15,8 mg) 8,0% KH 0,2% Pr 0,2%
Äscin 8x10-6M (69,3%)	(84-87) 86 (9,6 mg) 9,4% KH 0,7% Pr 2,1%	(88-90) 89 (6,8 mg) 6,7% KH 8,9% Pr 6,6% P 2,0%	(91-97) 93 (36,9 mg) 36,3% KH 2,9% Pr 0,6% P 0,1%		(98-103) 100 (10,9 mg) 10,7% KH 0,8% Pr 0,3% P 0,3%

Tabelle 10. (Seite 1):
(vgl. Text S. 160)

Trennungen von abgelösten Oberflächenmaterial mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung

Probe	Besonderheiten	0,80- 1,00	1,20- 1,80	2,30- 2,80	3,40- 3,90	4,20- 4,50	5,50- 5,80	6,40- 6,80	8,40- 8,80	9,60	11,50
15' Ä			2,00 A 1,66 Ä 1,28 F		3,87 A 3,87 Ä	4,53 A		6,44 A	8,90 A		11,55 A
15' Ä		1,00 F	1,70 F	2,77 A 2,77 Ä		4,43 A	5,63 A	6,79 A	8,75 A		11,91 A
15' Ä überladen			1,59 A 1,59 F		3,39 A 3,66 Ä	4,27 A	5,34 A	6,56 A	9,04 A		11,70 A
40' Ä			1,24 A 1,24 F		3,41 A 3,41 Ä	4,28 A 4,20 Ä	5,80 A	6,37 A			

Fortsetzung nächste Seite

Erklärung: A = Absorption; Ä = Äscin; F = Fucose; 0,80 - 1,00 = pH-Bereich 0,80 - 1,00
15' Ä = 15 min Inkubation der Zellen mit Äscin; F 30' 70°C = Wärmefällung
30 min bei 70°C

Fortsetzung von der letzten Seite
Tabelle 10. (Seite 2):

Probe	Besonder- heiten	0,80- 1,00	1,20- 1,80	2,30- 2,80	3,40- 3,90	4,20- 4,50	5,50- 5,80	6,40- 6,80	8,40- 8,80	9,60	11,50
40' Ä				2,32 A 2,72 Ä		4,28 A 4,28 Ä		6,39 A			
15' Ä		0,76 Ä	1,52 Ä 1,52 F								
15' Ä				2,19 A	3,22 A 3,09 Ä	4,04 A	5,08 A		8,49 A		12,08 A
15' Ä			2,11 Ä		3,49 A	4,47 A 4,15 Ä	5,89 A		8,32 A		11,72 A
40' Ä			1,35 A	2,35 Ä	3,28 A	4,28 A 4,17 Ä	5,83 A		8,65 A		11,88 A
40' Ä			1,47 A 1,78 Ä		3,14 A 3,14 Ä	4,19 A 4,19 Ä	5,82 A	6,38 A			11,87 A

Fortsetzung von der letzten Seite

Tabelle 10 (Seite 3):

Probe	Besonderheiten	0,80- 1,00	1,20- 1,80	2,30- 2,80	3,40- 3,90	4,20- 4,50	5,50- 5,80	6,40- 6,80	8,40- 8,80	9,60	11,50
20' Ä			1,43 Ä	2,54 A 2,54 Ä				6,81 A			
40' Ä	F 30' 70°C		1,52 A 1,62 Ä 1,35 F	2,90 A	3,25 A	4,44 A	5,91 A	6,90 A		9,93 A	
40' Ä			1,16 A 1,96 F	2,61 A 2,61 Ä	3,97 A	4,76 A	5,80 A			9,65 A	
15' Ä	F 2,5' 80°C		1,47 A 1,87 Ä		3,69 A	4,68 A		6,81 A	8,61 A		12,20 A
20' A	F 45' 80°C		1,32 A 1,32 Ä		3,50 A 3,62 Ä	4,19 A	5,57 A	7,01 A	8,98 A		
20' Ä	F 2' 75°C		1,49 A 1,49 Ä		3,38 A 3,09 Ä	4,62 A		6,76 A	8,74 A		11,12 A

Fortsetzung von der letzten Seite

Tabelle 10 (Seite 4)

Probe	Besonderheiten	0,80- 1,00	1,20- 1,50	2,30- 2,80	3,40- 3,90	4,20- 4,50	5,50- 5,80	6,40- 6,80	8,40- 8,80	9,60	11,50
40' Ä	F 45' 75°C	0,85 Ä			3,31 A	4,46 A	5,05 A 5,05 Ä		8,96 A		
15' Ko			1,31 F	2,56 A	4,02 A				8,51 A		11,77 A
15' Ko			1,55 F	2,33 A	3,81 A	4,87 A		6,80 A	8,71 A		11,90 A
15' Ko				2,51 A	3,36 A	4,24 A	5,65 A				11,76 A
40' Ko					3,49 A	4,12 A	5,32 A	6,93 A			11,89 A
40' Ko		1,08 A			3,69 A	4,86 A		6,71 A	8,99 A		
40' Ko			1,69 F	2,19 A	3,59 A	4,79 A	5,86 A	7,07 A		9,30 A	

Fortsetzung von der letzten Seite

Tabelle 10 (Seite 5):

Probe	Besonder- heiten	0,80- 1,00	1,20- 1,30	2,30- 2,80	3,40- 3,90	4,20- 4,50	5,50- 5,80	6,40- 6,80	8,40- 8,80	9,60	11,50
15' Ä	Dialyse	0,80 Ä 0,88 F			3,39 A 3,50 Ä	4,38 A	5,05 A 5,74 Ä				11,31 A
15' Ko	Dialyse	0,76 F			3,17 A	4,59 A					11,77 A
15' Tr	Trypsin					4,36 A	5,65 A	6,81 A			

Zusammenfassung von Tabelle 10 (26 Versuche):

	0,80- 1,00	1,20- 1,80	2,30- 2,80	3,40- 3,90	4,20- 4,50	5,50- 5,80	6,40- 6,80	8,40- 8,80	9,60
A	-/1/-/-	3/4/4	4/5/2/-	7/7/2/6	10/2/3/8	2/2/3/10	-/3/5/8	-/-/2/2	-/2/2/-
Ä	1/2	4/5	3/2	6/3	1/4	1/1			
F	2	10							

Mittelwerte der jeweiligen Maxima

A	1,53	2,46	3,56	4,37	5,46	6,76	8,78	9,66
Ä	0,86	1,05	2,56	3,44	4,18	5,74		
F	0,86	1,52						

Erklärung:

A = Absorption; Ä = Äscin; F = Fucose

1,20 - 1,30

A 3/4/4/- = im pH-Bereich von 1,20 - 1,30 liegen von den 26 Versuchen 3 x der 1. Hauptpeak, 4 x der 2. Hauptpeak und 4 x der 3. Hauptpeak

Tabelle 18 (vgl. Text S. 175/179):

Auftrennung mittels Säulengelchromatographie von ^{14}C -Fucose-markiertem Material, das von Yoshida-Ascitestumorzellen unter Kontrollbedingungen bzw. durch Äscin, Trypsin oder Neuraminidase abgelöst wurde (In der Tabelle sind nur die ^{14}C -Fucose-markierten Peaks enthalten).

Proben	Fraktionsbereiche			
	58/61	67/70	81/84	91/94
7' Ä	F		F	F
7' Ä	F		F	F
15' Ä	F		F	F
7' Ko		F	F	
7' Tr		F		F
7' N			F	F

Erklärung: 7' Ä = Y.A.T.Z., die 7 min mit Äscin
inkubiert waren

F = Fucose-haltiger Peak

Tabelle 24:

(vgl. Text S. 208)

Trennungen von abgelösten Oberflächenmaterial mit Hilfe der Sephadex-Säulenchromatographie

Ko 29,4% Verlust		(42-51)46 (1,56 mg)1,3% KH 26,3% Pr 4,2% S 0,2%				(85-94)90 (33,29 mg)28,1% KH 0,8% Pr 0,6% S 0,02%	(95-140)102 Verlust
G1 70,7% <u>Ko</u>		(43-53)47 (3,83 mg)6,8% KH 6,9% Pr 47,3% S 0,4%	(68-82) (3,40 mg)6,0% KH 2,6% Pr 3,2% S 0,1%	(83-88) (3,41 mg)6,0% KH 2,0% Pr 2,6% S 0,02%		(89-96)92 (15,49 mg)27,4% KH 0,5% Pr 0,4% S 0,01%	(97-105)100 (13,91 mg)24,6% KH 0,3% Pr 0,6% S 0,01%
G1 45,6% Verlust	(36-40) (1,08 mg)1,9% KH 1,8% Pr 9,3% S 0,04%	(41-51) 44 Verlust		(76-93)85 (15,91 mg)28,1% KH 0,4% Pr 1,5% S 0,02%			(94-104)98 (8,81 mg)15,6% KH 0,4% Pr 1,0% S 0,02%
Ko 59,0%		(42-54)47 (4,79 mg)8,0% KH 6,9% Pr 34,3% S 0,2%				(85-93)91 (10,28 mg)17,2% KH 1,8% Pr 1,2% S 0,02%	(94-104)99 (20,13 mg)33,7% KH 0,6% Pr 0,5% S 0,01%
<u>K</u> G1 53,3%		(35-50)44 (3,30 mg)5,3% KH 8,8% Pr 33,8% S 0,2%	(60-80)74 (3,71 mg)6,0% KH 3,1% Pr 3,7% S 0,1%	(81-93)87 (20,12 mg)32,5% KH 0,3% Pr 0,6% S 0,01%			(94-103)99 (5,87 mg)9,5% KH 1,2% Pr 1,2% S 0,01%

Fortsetzung nächste Seite

Trennungen von abgelösten Oberflächenmaterial mit Hilfe der Sephadex-Säulenchromatographie

Ko 46,5% Verlust	(40-67)52 KH 12,8% Pr 4,5% S 54,2%	(68-84) KH 5,6% Pr 2,4% S 17,6%	(85-97)92 KH 28,2% Pr 0,8% S 2,9%	(98-105)100 Verlust
	(38-65)52 KH 16,5% Pr 6,5% S 42,2%		(80-99)91 KH 27,5% Pr 0,7% S 6,3%	(100-107)103 KH 13,2% Pr 5,6% S 3,0%
Tr G1 57,2%	(40-52)49 KH 8,6% Pr 3,8% S 55,2%		(83-99)91 KH 37,9% Pr 0,4% S 1,4%	(100-111)106 KH 16,2% Pr 1,1% S 1,3%
	(42-55)48 KH 8,3% Pr 59,8% S 0,6%		(90-97)93 KH 29,9% Pr 0,4% S 0,8%	(98-105)100 KH 18,8% Pr 0,8% S 0,9%
N G1 66,2%			(67-89)83 KH 9,2% Pr 2,5% S 4,1%	

Die Inkubationszeit für die Yoshidazellen betrug 7 min.

Erklärung: KH = Kohlenhydrat; Pr = Protein; S = Sialinsäure

Ko Ko bzw. Ko G1 = Trennung einer Probe des abgelösten Materials, das 1h ohne bzw. mit 14-C-Glukosamin vorbehandelt war

Literaturverzeichnis

- Abelev, G.I.: Antigenic structure of chemically-induced hepatomas. *Progr.Exp.Tumor Res.* 7 (1965) 104-157
- Abercrombie, M., Ambrose, E.J.: Interference microscope studies of cell contacts in tissue culture. *Exp.Cell Res.* 15 (1958) 332-345
- Abercrombie, M., Ambrose, E.J.: Surface properties of cancer cells: review. *Cancer Res.* 22 (1962) 525-548
- Adamson, L.F., Langeluttig, S.G., Anast, C.S.: Inhibition by puromycin of amino acid transport by embryonic chick bone. *Biochim.Biophys.Acta* 115 (1966) 355-360
- Ågren, G., Ronquist, G.: Formation of extracellular adenosine triphosphate by tumour cells. *Acta Physiol.Scand.* 22 (1968) 1-5
- Akedo, H., Christensen, H.N.: Nature of insulin action on amino acid uptake by the isolated diaphragm. *J.Biol.Chem.* 237 (1962) 118-122
- Alexander, P., Delorme, E.F., Hamilton, L.D.G., Hall, F.G.: Effect of nucleic acids from immune lymphocytes on rat sarcomata. *Nature* 213 (1967) 569-572
- Ambrose, D.J., James, A.M., Lowick, J.H.B.: Differences between electrical charge carried by normal and homologous tumour cells. *Nature* 177 (1956) 576-577
- Aoki, T., Boyse, E.A., Old, L.J., Harven, E., Hämmerling, U., Wood, H.A.: G(Gross) and H-2 cell-surface antigens: Location on Gross leukemia cells by electron microscopy with visually labeled antibody. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 65 (1970) 569-576
- Ashmore, J., Weber, Dickens, F., Randle, P.J., Whelan: In: *Carbohydrate Metabolism and its disorders*. Vol.1, S.335, Academic Press N.Y. 1968
- Avruch, J., Carter, J.R., Martin, D.B.: Insulin-stimulated plasma membranes from rat adipocytes: Their physiological and physicochemical properties. *Biochim.Biophys.Acta* 288 (1972) 27-42
- Avruch, J., Pohl, S.L.: The plasma membrane initiator systems for the actions of insulin and glucagon. In: *Biological Membranes* Vol. 2, S.185-219. Eds.: Chapman, D., Wallach, D.F.H., Academic Press N.Y. 1973
- Baker, P.F.: Sodium-Calcium exchange across the nerve cell membrane. In: *Calcium and cellular function*. S.96-107. Ed.: Cuthbert, A.W., Macmillan 1970

- Baldwin, R.W., Glaves, D.: Deletion of liver-cell surface membrane components from amino-azo-dye induced rat hepatomas. *Int..J.Cancer* 9 (1972) 76-85
- Baldwin, R.W., Barker, C., Embleton, M., Glaves, D.: Demonstration of cell surface antigens on chemically induced tumors. *Ann. N.Y. Acad.Sci.* 177 (1971) 268-278
- Ball, E.G., Martin, D.B., Cooper, O.: Studies on the metabolism of adipose tissue. *J.Biol.Chem.* 234 (1959) 774-780
- Barski, G., Belehradsek, Jr.: Etude microcinématographique du mécanisme d'invasion cancéreuse en cultures de tissu normal associé aux cellules malignes. *Exp.Cell Res.* 37 (1965) 464-480
- Baumann, K., Kinne, R.: The effect of sodium on the transtubular transport of D-glucose in rat kidney and on the D-glucose binding to isolated brush border membranes. In: Na-linked transport of organic solutes. S.130-133. Ed. Heinz, E., Springer verlag Berlin, Heidelberg, New York 1972
- Behnke, O.: Electron microscopical observations on the surface coating of human blood platelets. *J.Ultrastruct.Res.* 24 (1968) 51-69
- Bekesi, J.G., Winzler, R.J.: The metabolism of plasma glycoproteins studies on the incorporation of L-fucose-1-14C into tissue and serum in the normal rat. *J.Biol.Chem.* 242 (1967) 3873-3879
- Bell, C., Dray, S.: Conversion of non-immune rabbit spleen cells by ribonucleic acid of lymphoid cells from an immunized rabbit to produce Ig G antibody of foreign light chain allotype. *J.Immunol.* 105 (1970) 541-556
- Benedetti, E.L., Emmelot, P.: Studies on plasma membranes. IV. Localization and content of sialic acid in plasma membranes isolated from rat liver and hepatoma. *J.Cell Sci.* 2 (1967) 499-512
- Bennett, G.: Migration of glycoprotein from Golgi apparatus to cell coat in the columnar cells of the duodenal epithelium. *J.Cell Biol.* 45 (1970) 668-678
- Bennett, G., Leblond, C.P.: Formation of cell coat material for the whole surface of columnar cells in the rat small intestine, as visualized by radioautography with L-fucose-³H. *J.Cell Biol.* 46 (1970) 409-416
- Bennett, G., Leblond, C.P.: Passage of fucose -³H label from the Golgi apparatus into dense and multivesicular bodies in the duodenal columnar cells and hepatocytes of the rat. *J.Cell Biol.* 51 (1971) 875-888
- Bennett, H.S.: Morphological aspects of extracellular polysaccharides. *J.Histochem.Cytochem.* 11 (1963) 14-23

- Benson, A.A.: The cell embrane: A lipoprotein monolayer. In: Membrane Models and the Formation of Biological Membranes, S. 190-202, Eds.: Bolis, L., Pethica, B.A., North-Holland Publishing Company Amsterdam 1968
- Bergelson, L.D., Dyatlovitskaya, E.V., Torknovskaya, T.I., Sorokina, J.B., Gorkova, N.P.: Phospholipid composition of membranes in the tumor cell. *Biochim.Biophys.Acta* 210 (1970) 287-298
- Bernhard, W., Avrameas, S.: Ultrastructural visualization of cellular carbohydrate components by means of concanavalin A. *Exp.Cell Res.* 64 (1971) 232-236
- Bhattacharyya, P., Epstein, W., Silver, S.: Valinomycin-induced uptake of potassium in membrane vesicles from *Escherichia coli*. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 68 (1971) 1488-1492
- Bianchi, C.P., Shanes, A.M.: Calcium influx in skeletal muscle at rest, during activity, and during potassium contracture. *J.Gen.Physiol.* 42 (1958/1959) 803-815
- Bissell, M.J., Hatié, C., Rubin, H.: Patterns of glucose metabolism in normal and virus-transformed chick cells in tissue culture. *J.Natl.Cancer Inst.* 49 (1972) 555-565
- Blaustein, M.P.: The interrelationship between sodium and calcium fluxes across cell membranes. *Rev.Physiol.Biochem. Pharmacol.* 70 (1974) 33-82
- Blecher, M.: Phospholipase C and mechanisms of action of insulin and cortisol on glucose entry into free adipose cells. *Biochim.Biophys.Res.Comm.* 21 (1965) 202-209
- Blecher, M.: On the mechanism of action of phospholipase A and insulin on glucose entry into free adipose cells. *Biochim.Biophys.Res.Comm.* 23 (1966) 68-74
- Blecher, M.: Effects of insulin and phospholipase A on glucose transport across the plasma membrane of free adipose cells. *Biochim.Biophys.Acta* 137 (1967) 557-571
- Blecher, M.: Insulin-like, antilipolytic actions of phospholipase A in isolated rat adipose cells. *Biochim.Biophys.Acta* 187 (1969) 380-384
- Boehmer, H.v., Eayer, R., Gladigan, V., Ruhenstroth-Bauer, G.: Die Beziehung zwischen der cytotoxischen und elektrokinetischen Wirkung von humanerum auf L-Zellen und Yoshida-Hepatom-Asciteszellen. *Zeitschr.Naturforsch.* 25b (1970) 205-212
- Bomstein, R., Goldbeyer, R., Tisdale, H.: Studies on the electron transport system. XXXIV Isolation and properties of mammalian cytochrome C₁. *Biochim.Biophys.Acta* 50 (1961) 527-543
- Borek, C., Sachs, L.: The difference in contact inhibition of cell replication between normal cells and cells transformed by different carcinogens. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 56 (1966) 1705-1711

- Borle, A.B.: Kinetic analyses of calcium movements in Hela cell cultures. I. Calcium influx. J.Gen.Physiol. 53 (1969a) 43-56
- Borle, A.B.: Kinetic analyses of calcium movements in Hela cell cultures. II. Calcium efflux. J.Gen.Physiol. 53 (1969b) 57-69
- Borle, A.B.: Calcium metabolism at the cellular level. Fed. Proc. 32 (1973) 1944-1950
- Bosmann, H.B.: Glycoprotein biosynthesis. Subcellular localization and activity in 3T3 and SV-3T3 fibroblasts of glycoprotein. N-acetylglucosaminyl transferases. Febs Letters 8 (1970) 29-32
- Bosmann, H.B.: Sialyl transferase activity in normal and RNA- and DNA-virus transformed cells utilizing desialyzed, trypsinized cell plasma membrane external surface glycoproteins as exogenous acceptors. Biochim.Biophys.Res. Comm. 49 (1972) 1256-1262
- Boyer, P.D.: Carboxylactivation as a possible common reaction in substrate-level and oxidative phosphorylation and in muscle contraction. In: Oxidases and Related Redox Systems. Vol.2, S.994. Eds.: King, T.E., Mason, H.S., Morrison, M., Wiley and sons, New York 1965
- Brady, R.O., Fishman, P.H., Mora, P.T.: Membrane components and enzymes in virally transformed cells. Fed.Proc. 32 (1973) 102-108
- Brand, A., Deckner, K.: Quantitative relationship between the pentosephosphate pathway and the nucleotide synthesis in ascites tumor cells. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 351 (1970) 711-717
- Braun, T., Hechter, O., Rudinger, J.: "Insulin-like" action of oxytocin: Evidence for separate systems in fat cells. Endocrinology 85 (1969) 1092-1096
- Brawn, R.J.: In vitro desensitization of sensitized murine lymphocytes by a serum factor. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 68 (1971) 1634
- Bray, G.A.: A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. Analyt.Biochem. 1 (1960) 279
- Bretscher, M.S.: Cell membrane-principal glycoprotein on the surface extends into the interior in human erythrocytes. Nature (New Biol.) 231 (1971) 229-231
- Bretscher, M.S.: Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes. Nature (New Biol.) 236 (1972) 11-12

- Bruchhausen, F.v., Herken, H.: Wirkung des 6-Aminonicotinsäure-amids auf die insulinabhängige Glucoseaufnahme in das epididymale Fettgewebe. Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmak.exp.Path. 254 (1966) 388-400
- Bruchhausen, F.v., Herken, H., Voss, H.J., Merker, H.J.: Wirkung von Triamteren auf insulinstimulierbare Prozesse des Fettgewebes. Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmak.exp.Path. 256 (1967) 416-429
- Bruchhausen, F.v.: Hemmung des α -Aminoisobuttersäure-Transportes in das isolierte Fettgewebe durch N^6, O^2 -Dibutyryl-Adenosin-3,5-Phosphat. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 349 (1968) 1437-1439
- Bruchhausen, F.v., Kaiser, J., Herken, H.: Über Wirkungen von N-Amidino-3,5-diamino-6-chloro-pyrazincarboxamid (Amilorid) auf den Glukosetransport und die Proteinsynthese des epididymalen Fettgewebes der Ratte. Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmak.exp.Path. 262 (1969) 139-151
- Buck, C.A., Glick, M.C., Warren, L.: A comparative study of glycoproteins from the surface of control and Rous sarcoma virus transformed hamster cells. Biochemistry 9 (1970) 4567-4576
- Buck, C.A., Glick, M.C., Warren, L.: Effect of growth on the glycoproteins from the surface of control and Rous sarcoma virus transformed hamster cells. Biochemistry 10 (1971a) 2176-2180
- Buck, C.A., Glick, M.C., Warren, L.: Glycopeptides from the surface of control and virus-transformed cells. Science 172 (1971b) 169-171
- Buffe, D., Kimbaut, Ch., Durtin, P.: Etude par la concanavaline fluorescente des sites glucidiques des membranes de cellules humaines; rapport avec la différenciation cellulaire. C.R.Acad.Sci.Paris 273 (1971) 1391-1393
- Burger, M.M., Goldberg, A.R.: Identification of a tumour-specific determinant on neoplastic cell surfaces. Proc. Natl.Acad.Sci.USA 57 (1967) 359-366
- Burger, M.M., Noonan, K.D.: Restoration of normal growth by covering of agglutinin sites on tumor cell surface. Nature 228 (1970) 512-516
- Burger, M.M., Martin, G.S.: Agglutination of cells transformed by Rous sarcoma virus by wheat germ agglutinin and concanavalin A. Nature New Biol. 237 (1972) 9-12
- Burger, M.M.: Surface changes in transformed cells detected by lectins. Fed.Proc. 32 (1973) 91-101
- Burk, L., Woods, M., Hunter, J.: On the significance of glycolysis for cancer growth, with special reference to Morris rat hepatomas. J.Natl.Cancer Inst. 38 (1967) 839-863

- Burton, D.C.: Cellular communication, contact inhibition cell clocks, and cancer: The impact of the work and ideas of W.R. Loewenstein. *Perspect.Biol.Med.* 14 (1971) 301-318
- Butcher, R.W., Sneyd, J.G.T., Park, C.R., Sutherland, E.W.: Effect of insulin on adenosine-3,5-monophosphate in the rat epididymal fat pad. *J.Biol.Chem.* 241 (1966) 1651-1653
- Butcher, R.W., Sutherland, E.W.: The effects of the catecholamines, adrenergic blocking agents, prostaglandin E₁, and insulin on cyclic AMP levels in the rat epididymal fat pad in vitro. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 139 (1967) 849-859
- Butcher, R.W., Baird, C.E., Sutherland, E.W.: Effects of lipolytic and antilipolytic substances on adenosine-3,5-monophosphate levels in isolates fat cells. *J.Biol.Chem.* 243 (1968) 1705-1712
- Caccam, J., Eylar, E.H.: Glycoprotein biosynthesis: Purification and characterization of a glycoprotein: Galactosyl transferase from Ehrlich ascites tumor cell membranes. *Arch. Biochem.Biophys.* 137 (1970) 315-324
- Caldwell, P.C., Hodgkin, A.L., Keynes, R.D., Shaw, T.I.: The effects of injecting "energy-rich" phosphate compounds on the active transport of ions in the axons of loligo. *J.Physiol.* 152 (1960) 561-590
- Caldwell, P.C.: Factors governing movement and distribution of inorganic ions in nerve and muscle. *Physiol.Rev.* 48 (1968) 1-64
- Caldwell, P.C.: Models for sodium/potassium transport: a critique. In: *Membranes and Ion transport Vol.1*, S.433-461. Ed.: Bittar, E.E., Wiley-Interscience London, New York, Sydney, Toronto 1970
- Caputo, M., Marcante: Studies on the structure of α_1 -glycoprotein isolated from Yoshida ascites tumor. *Arch.Biochem. Biophys.* 105 (1964) 193-196
- Caygill, C.P.J., Stein, W.D.: Glucose uptake by isolated fat cells and the influence of insulin. *Biochem.J.* 105 (1967) 17P
- Chance, B.: The energy-linked reaction of calcium with mitochondria. *J.Biol.Chem.* 240 (1965) 2729-2748
- Chapman, D.: Some recent studies of lipids, lipid-cholesterol and membrane systems. In: *Biological Membranes Vol.2*, S.91-144, Ed.: Chapman, D., Wallach, D.F.H., Academic Press, London, New York 1973
- Chopra, H.C., Mason, M.M.: A new virus in a spontaneous mammary tumor of a Rhesus monkey. *Cancer Res.* 30 (1970a) 2081-2086
- Chopra, H.C., Bogden, A.E., Zelljadt, J., Jensen, E.M.: Virus particles in a transplantable rat mammary tumor of spontaneous origin. *Eur.J.Cancer* 6 (1970b) 287-290

- Christensen, H.N., Riggs, T.E., Ray, N.E.: Concentrative uptake of amino acids by erythrocytes in vitro. *J.Biol.Chem.* 194 (1952) 41-51
- Christensen, H.N., Liang, M., Archer, E.G.: A distinct Na^+ -requiring transport system for alanine, serine, cysteine, and similar amino acids. *J.Biol.Chem.* 242 (1967) 5237-5246
- Christensen, H.N.: Histidine transport into isolated animal cells. *Biochim.Biophys.Acta* 165 (1968) 251-261
- Christensen, H.N.: Linked ion and amino acid transport. In: *Membranes and Ion Transport Vol.I*, Ed.: Bittar, E.E., S.365-394, Wiley, London, New York, Sydney, Toronto 1970
- Cirrillo, V.P., Young, D.K.M.: Uphill sorbose transport induced by counterflow in Ehrlich ascites cells. *Arch.Biochem.Biophys.* 105 (1964) 86-88
- Clausen, T., Elbrink, J., Martin, B.R.: Insulin controlling calcium distribution in muscle and fat cells. *Acta endocrinol.* 77 (1974) 137-143
- Coffey, J.W., Miller, O.N., Sellinger, O.Z.: The metabolism of L-fucose in the rat. *J.Biol.Chem.* 239 (1964) 4011-4017
- Coffin, J.M., Temin, H.M.: Comparison of Rous sarcoma virus-specific deoxyribonucleic acid polymerases in virions of Rous sarcoma virus and in Rous sarcoma virus-infected chicken cells. *J.Virol.* 7 (1971) 625-634
- Colby, C., Romano, A.H.: Phosphorylation but not transport of sugars is enhanced in virus-transformed mouse 3T3 cells. *J. Cell Physiol.* 85 (1975) 12-23
- Coman, D.R.: Cellular adhesiveness in relation to the invasiveness of cancer: Electron microscopy of liver perfused with a chelating agent. *Cancer Res.* 14 (1954) 519-521
- Coman, D.R., Anderson, T.F.: A structural difference between the surfaces of normal and of carcinomatous epidermal cells. *Cancer Res.* 15 (1955) 541-543
- Coman, D.R.: Reduction in cellular adhesiveness upon contact with a carcinogen. *Cancer Res.* 20 (1960) 1202-1204
- Coman, D.R.: Adhesiveness and stickiness: Two independent properties of the cell surface. *Cancer Res.* 21 (1961) 1436-1438
- Cone, R.E., Marchalonis, J.J., Kolley, R.T.: Lymphocyte membrane dynamics. *J.Exp.Med.* 134 (1971) 1373
- Cook, G.M.W., Heard, D.H., Seaman, G.V.F.: The electrokinetic characterization of the Ehrlich ascites carcinoma cell. *Exp.Cell Res.* 28 (1962) 27-39

- Cook, G.M.W., Jacobson, W.: The electrophoretic mobility of normal and leukaemic cells in mice. *Biochem.J.* 107 (1968) 549-557
- Cook, G.M.W., Stoddart, R.W.: Structures of mucopolysaccharides, glycolipids and glycoproteins of animal cell surfaces. Fungal cell walls. In: Surface carbohydrates of the eukaryotic cell. S.98-164, Academic Press, London, New York 1973
- Crane, R.K., Field, R.A., Coric, F.: Studies of tissue permeability. I. The penetration of sugars into the Ehrlich ascites tumor cells. *J.Biol.Chem.* 224 (1957) 649-662
- Crane, R.K.: Hypothesis for mechanism of intestinal active transport of sugars. *Fed.Proc.* 21 (1962) 891-895
- Crane, R.K.: Na⁺-dependent transport in the intestine and other animal tissues. *Fed.Proc.* 24 (1965) 1000-1006
- Crofford, O.B., Renold, A.E.: Glucose uptake by incubated rat epididymal adipose tissue. *J.Biol.Chem.* 240 (1965) 14-21
- Csáky, T.Z.: A possible link between active transport of electrolytes and nonelectrolytes. *Fed.Proc.* 22 (1963) 3-7
- Cuatrecasas, P.: Interaction of insulin with the cell membrane: The primary action of insulin. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 63 (1969) 450-457
- Cuatrecasas, P.: Insulin-receptor interactions in adipose tissue cells: Direct measurement and properties. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 68 (1971) 1264-1268
- Cuatrecasas, P., Illiano, G.: Membrane sialic acid and the mechanism of insulin action in adipose tissue cells. Effects of digestion with neuraminidase. *J.Biol.Chem.* 246 (1971) 4938-4946
- Cuatrecasas, P.: Unmasking of insulin receptors in fat cells and fat cell membranes. *J.Biol.Chem.* 246 (1971) 6532-6542
- Cuatrecasas, P.: Isolation of the insulin receptor of liver and fat cell membranes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 69 (1972) 318-322
- Culp, L.A., Grimes, W.J., Black, P.H.: Contact-inhibited revertant cell lines isolated from SV40-transformed cells. *J.Cell Biol.* 50 (1971) 682-690
- Curtis, B.A.: Ca⁺⁺ fluxes in single twitch muscle fibers. *J.Gen. Phys.* 50 (1967) 255-267
- Dahms, A.S., Anderson, R.L.: Pathway of D-fucose metabolism. *Fed.Proc.* 28 (1969) 540
- Danielli, J.F., Davson, H.: A contribution to the theory of permeability of thin films. *J.Cell.Comp.Physiol.* 5 (1935) 495-508

- Davson, R.M.C., Hauser, H.: Binding of calcium to phospholipids. In: Calcium and cellular function, S.17-41. Ed.: Cuthbert, A.W., Macmillan 1970
- Deenen, L.L.M.van: Membrane Lipids. In: Regulatory Functions of Biological Membranes, S.72-86. Ed.: Järnefelt, J., Elsevier publishing company, Amsterdam, London, New York 1968
- Denton, R.M., Yorke, R.E., Randle, P.J.: Measurements of concentrations of metabolites in adipose tissue and effects of insulin, alloxan-diabetes and adrenalin. *Biochem.J.* 100 (1966) 407-419
- Lische, Z.: Reciprocal relation between fucose and sialic acid in mammalian glycoproteins. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 106 (1963) 259-700
- Doljanski, F.: A new look at the cell surface. *Israel J.Med.Sci.* 9 (1973) 251-257
- Drysdale, K.G., Herrick, P.R., Franke, D.: The specificity of the hemagglutinin of the castor bean, *ricinus communis*. *Vox Sang.* 15 (1968) 194-202
- Ebashi, S., Endo, M.: Calcium ion and muscle contraction. *Progr.Biophys.Mol.Biol.* 18 (1968) 123-183
- Eckhart, W., Dulbecco, R., Burger, M.M.: Temperature-dependent surface changes in cells infected or transformed by a thermosensitive mutant of polyoma virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 68 (1971) 283-286
- Eddy, A.A., Mulcahy, M.R., Thompson, P.J.: The effects of sodium ions and potassium ions on glycine uptake by mouse ascites-tumour cells in the presence and absence of selected metabolic inhibitors. *Biochem. J.* 103 (1967) 863-876
- Eddy, A.A.: A net gain of sodium ions and a net loss of potassium ions accompanying the uptake of glycine by mouse ascites tumour cells in the presence of sodium cyanide. *Biochem.J.* 108 (1968a) 195-206
- Eddy, A.A.: The effects of varying the cellular and extracellular concentrations of sodium and potassium ions on the uptake of glycine by mouse ascites-tumor cells in the presence and absence of sodium cyanide. *Biochem.J.* 108 (1968b) 489-498
- Eddy, A.A., Hogg, M.C.: Further observations on the inhibitory effect of extracellular potassium ions on glycine uptake by mouse ascites-tumor cells. *Biochem.J.* 114 (1969) 807-814
- Eng, C.P., Morgan, J.F.: The release of nucleic acids and protein from ascites tumor cells incubated with glycerol, dimethylsulfoxide, and inositol. *Can.J.Biochem.* 47 (1969) 871-876
- Eylar, E.H.: On the biological role of glycoproteins. *J.Theor. Biol.* 10 (1965) 89-113

- Fain, J.N.: Effects of dexamethasone and growth hormone on fatty acid adrenalectomized rats. *Endocrinology* 71 (1962) 633-635
- Fain, J.N., Kovacev, V.P., Scow, R.O.: Effect of growth hormone and dexamethasone on lipolysis and metabolism in isolated fat cells of the rat. *J.Biol.Chem.* 240 (1965) 3522-3529
- Fain, J.N., Galton, D.J., Kovacev, V.P.: Effect of drugs on the lipolytic action of hormones in isolated fat cells. *Mol. Pharmacol.* (1966) 237-247
- Falke, D.: Die Entstehung von Virustumoren. *Dtsch.med.Wochenschr.* 96 (1971) 1167-1172
- Feller, D.D., Feist, E.: Metabolism of adipose tissue: Incorporation of iso-leucine-carbon into lipids by slices of adipose tissue. *J. Lipid Res.* 1 (1959) 90-96
- Feller, W.F., Chopra, H.C.: A small virus-like particle observed in human breast cancer by means of electron microscopy. *J.Natl.Cancer Inst.* 40 (1968) 1359
- Fishman, M.: Antibody formation in vitro. *J.Exp.Med.* 114 (1961) 837-856
- Forrester, J.A., Ambrose, E.J., McPherson, J.A.: Electrophoretic investigations of a clone of hamster fibroblasts and polyoma-transformed cells from the same population. *Nature* 196 (1962) 1068-1069
- Forrester, J.A., Ambrose, E.J., Stoker, M.G.P.: Microelectrophoresis of normal and transformed clones of hamster kidney fibroblasts. *Nature* 201 (1964) 945-946
- Forrester, D.O., Pardee, A.B.: Transport of amino acids by confluent and nonconfluent 3T3 and polyoma virus-transformed 3T3 cells growing on glass cover slips. *J.Biol.Chem.* 244 (1969) 2675-2681
- Fox, T.O., Sheppard, J.R., Burger, M.M.: Cyclic membrane changes in animal cells: transformed cells permanently display a surface architecture detected in normal cells only during mitosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 68 (1971) 244-247
- Fox, C.F.: The structure of cell membranes. *Sci.Am.* 226 (1972) 31-39
- Frerichs, H., Ball, E.G.: Studies on the metabolism of adipose tissue. XVI. Inhibition by phlorizin and phloretin of the insulin-stimulated uptake of glucose. *Biochemistry* 3 (1964) 981-985
- Froesch, E.R., Ginsberg, J.L.: Fructose metabolism of adipose tissue. I. Comparison of fructose and glucose metabolism in epididymal adipose tissue of normal rats. *J.Biol.Chem.* 237 (1962) 3317-3321
- Frye, L.D., Edidin, M.: The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons. *J.Cell Sci.* 7 (1970) 319

- Fuhrmann, G.F., Granzer, E., Kübler, W., Rueff, F., Ruhenstroth-Bauer, G.: Neuraminsäurebedingte Strukturunterschiede der Zellmembran normaler und maligner Leberzellen. *Z.Naturforsch.* 17b (1962) 61u
- Garrard, W.T.: Selective release of proteins from spirillum itersonii by tris (hydroxymethyl) aminomethane and ethylenediaminetetraacetate. *J.Bact.* 105 (1971) 93-100
- Garth, L., Nicolson, G.L., Singer, S.J.: Ferritin-conjugated plant agglutinins as specific saccharide stains for electron microscopy: Application to saccharides bound to cell membranes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 68 (1971) 942-945
- Gasić, G., Loebel, F., Badínez, O.: Cementing substances in metastasizing and non-metastasizing transplantable tumours in mice. *Nature* 185 (1960) 864-865
- Gasić, G., Berwick, L.: Hole stain for sialic acid-containing mucins. *J.Cell Biol.* 19 (1962) 223-228
- Gasić, G., Gasić, T.: Removal and regeneration of the cell coating in tumor cells. *Nature* 196 (1962) 170
- Gattermann, L., Wieland, P.: In: *Die Praxis des organischen Chemikers*, S. 328-332. Walter de Gruyter, Berlin 1962
- Geering, G., Hardy jun., W.D., Old, L.J., Harven, E.de, Brodey, R.S.: Shared group-specific antigen of murine and feline leukemia viruses. *Virology* 36 (1968) 678-680
- Gerner, E.W., Glick, M.C., Warren, L.: Membranes of animal cells biosynthesis of the surface membrane during the cell cycle. *J.Cell.Phys.* 75 (1970) 275-280
- Gevers, W., Krebs, H.A.: The effects of adenine nucleotides on carbohydrate metabolism in pigeon-liver homogenates. *Biochem. J.* 98 (1966) 720-735
- Ghalambor, M.A., Heath, E.C.: The metabolism of L-fucose. II. The enzymatic cleavage of L-fuculose 1-phosphat. *J.Biol.Chem.* 237 (1962) 2427-2433
- Gilden, R.V., Lee, Y.K., Oroszlan, S., Walker, J.L., Huebner, R.J.: Reptilian C-type virus: Biophysical, biological, and immunological properties. *Virology* 41 (1970) 187-190
- Gingell, L., Garrod, D.R.: Divalent cations and cell adhesion. In: *Calcium and cellular function*, S.59-64. Ed.: Cuthbert, A.W., Macmillan 1970
- Glaser, M., Simpkins, H., Singer, S.J., Sheetz, M., Chau, S.: On the interactions of lipids and proteins in the red blood cell membrane. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 65 (1970) 721-728
- Glick, M.C., Gerner, E.W., Warren, L.: Changes in the carbohydrate content of the KB cell during the growth cycle. *J.Cell Physiol.* 77 (1971) 1-6

- Goldstein, I.J., So, L.L., Yang, Y., Callies, Q.C.: Protein-carbohydrate interaction. XIX. The interaction of concanavalin A with IgM and the glycoprotein phytohemagglutinins of the waxbean and the soybean. *J.Immunol.* 103 (1969) 695-698
- Gomperts, B., Lantelme, F., Stock, R.: Ion association reactions with biological membranes studied with the fluorescent dye 1-anilino-8-naphthalene sulfonate. *J.Membr.Biol.* 3 (1970) 241-246
- Goodman, H.M.: Stimulatory action of insulin on leucine uptake and metabolism in adipose tissue. *Am.J.Physiol.* 206 (1964) 129-132
- Goodman, H.M.: Alpha amino isobutyric acid transport in adipose tissue. *Am.J.Physiol.* 211 (1966) 815-820
- Goodman, H.M.: The effects of insulin on lipolysis evoked by cyclic AMP and its dibutyryl analog. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 130 (1969) 97-100
- Goto, M., Katavka, Y., Goto, K., Yokoyama, T., Sato, H.: Decrease in agglutinability of cultured tumor cells to concanavalin A at the plateau of cell growth. *Gann* 63 (1972) 505-506
- Gould, M.K., Chaudry, I.H.: The action of insulin on glucose uptake by isolated rat soleus muscle. I. Effects of cations. *Biochim.Biophys.Acta* 215 (1970) 249-257
- Gould, M.K., Chaudry, I.H.: The action of insulin on glucose uptake by isolated rat soleus muscle. II. Dissoziation of a priming effect of insulin from its stimulatory effect. *Biochim.Biophys.Acta* 215 (1970) 258-263
- Graff, S., McCarthy, A.S.: Energy costs of growth in continuous metazoan cell cultures. *Cancer Res.* 18 (1958) 741-746
- Green, D.L., Perdue, J.R.: Membranes as expressions of repeating units. *Proc.natl.Acad.Sci.USA* 55 (1966) 1295-1302
- Grimes, W.: Sialic acid transferases and sialic acid levels in normal and transformed cells. *Biochemistry* 9 (1970) 5083
- Groß, W.: Biologische Membranen. *Angew.Chem.* 83 (1971) 419-454
- Guidotti, G.: Membrane proteins. *Annu.Rev.Biochem.* 41 (1972) 731-752
- Gumaa, K.A., McLean, P.: The pentose phosphate pathway of glucose metabolism. *Biochem.J.* 115 (1969) 1009-1029
- Guroff, G., Fanning, G.R., Chirigos, M.A.: Stimulation of aromatic amino acid transport by p-fluorophenylalanine in the sarcoma 37 cell. *J.Cell.Comp.Physiol* 63 (1964) 323-331
- Habel, K.: Specific complement-fixing antigens in polyoma tumors and transformed cells. *Virology* 25 (1965) 55-61

- Hagemann, R.F., Evans, T.C.: Influence of dimethyl sulphoxide on glycine transport in sarcoma 180 tumour cells. *Nature* 218 (1968) 583-584
- Haglund, H.: Isoelectric Focusing in pH Gradients. In: *Methods of biochemical Analysis*. Vol. 19. LKB-Produkter, Stockholm 1967
- Haguenau, F.: The biological basis of medicine, S. 433. Eds.: Bittar, E.E., Bittar, N. Academic Press N.Y. 1969
- Hampel, H., Hofrichter, G., Liehn, H.D., Schlemmer, W.: Zur Pharmakologie der Äscin-Isomere unter besonderer Berücksichtigung von α -Äscin. *Arzneim.forsch.* 20 (1970) 209-214
- Hanahan, D.J., Olley, J.N.: Chemical nature of monophosphoinositides. *J.Biol.Chem.* 231 (1958) 813-828
- Hartmann, J.F., Buck, C.A., Defendi, V., Glick, M.C., Warren, L.: The carbohydrate content of control and virus-transformed cells. *J.Cell.Physiol.* 80 (1972) 159-166
- Hasselbach, W., Makinose, M., Fliehn, W.: Activation and inhibition of the sarcoplasmic calcium transport. In: *Calcium and cellular function*, S.75-84. Ed.: Cuthbert, A.W., Macmillan 1970
- Hatanaka, M., Huebner, R.J., Gilden, R.V.: Alterations in the characteristics of sugar uptake by mouse cells transformed by murine sarcoma viruses. *J.Natl.Cancer Inst.* 43 (1969) 1091-1096
- Hatanaka, M., Gilden, R.V.: Virus specified changes in the sugar transport kinetics of rat embryo cells infected with murine sarcoma virus. *J.Natl.Cancer Inst.* 45 (1970) 87-89
- Hatanaka, M., Hanafusa, H.: Analysis of a functional change in membrane in the process of cell transformation by Rous sarcoma virus; alteration in the characteristics of sugar transport. *virology* 41 (1970) 647-652
- Hatanaka, M., Augl, C., Gilden, R.V.: Evidence for a functional change in the plasma membrane of murine sarcoma virus-infected mouse embryo cells. Transport and transport-associated phosphorylation of ^{14}C -2-deoxy-D-glucose. *J.Biol.Chem.* 245 (1970) 714-717
- Heidelberger, M.: Chemical constitution and immunological specificity. *Annu.Rev.Biochem.* 25 (1956) 641-658
- Hein, J.: Über die Wirkungen von Äscin auf Mäuse Ascites-Tumorzellen. Dissertation Berlin 1971
- Heinz, E.: Kinetic studies on the "influx" of glycine- ^{14}C into the Ehrlich mouse ascites carcinoma cell. *J.Biol.Chem.* 211 (1954) 781-790

- Heinz, E., Mariani, M.A.: Concentration work and energy dissipation in active transport of glycine into carcinoma cells. *J.Biol.Chem.* 228 (1957) 97-111
- Heinz, E., Walsh, P.M.: Exchange diffusion, transport, and intracellular level of amino acids in Ehrlich carcinoma cells. *J.Biol.Chem.* 233 (1958) 1488-1493
- Heinz, E.: Transport of amino acids by animal cells. In: *Metabolic Pathways. VI. Metabolic transport*, S.455-501. Ed.: Hokin, L.E., Academic press, New York, London 1972
- Hendler, R.W.: Biological membrane ultrastructure. *Physiol.Rev.* 51 (1971) 66-97
- Henschler, D., Hempel, A., Schultze, B., Maurer, W.: Zur Pharmakokinetik von Aescin. *Arzneim.forsch. (Drug.res.)* 21 (1971) 1682-1692
- Hernandez, A., Sols, A.: Transport and phosphorylation of sugars in adipose tissue. *Biochem.J.* 86 (1963) 166-172
- Herrera, M.G., Renold, A.E.: Hormonal effects on glycine metabolism in rat epididymal adipose tissue. *Biochim.Biophys. Acta* 44 (1960) 165-167
- Hogg, J., Williams, M.J., Johnston, R.J.: Light intensity and the membrane parameters of *Nitella translucens*. *Biochim.Biophys. Acta* 173 (1969) 564-566
- Holden, J.T., Utech, N.M.: Actinomycin D inhibition of amino acid transport in *Streptococcus faecalis*. *Biochim.Biophys. Acta* 135 (1967) 351-354
- Hoppe, W., Gieren, A., Brodherr, Tschesche, R., Wulff, G.: Die Struktur des Hauptaglykons aus dem Roßkastaniensamen. *Angew.Chem.* 80 (1968) 563
- Huebner, R.J., Todaro, G.J.: Oncogenes of RNA tumor viruses determinants of cancer. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 64 (1969) 1087-1094
- Huet, Ch., Garrido, J.: Ultrastructural visualization of cell-coat components by means of wheat germ agglutinin. *Exp.Cell Res.* 75 (1972) 523-527
- Huet, Ch., Herzberg, M.: Effects of enzymes and EDTA on ruthenium red and concanavalin A labeling of the cell surface. *J.Ultrastr.Res.* 42 (1973) 186-199
- Hybl, A., Dorset, D.: The relevance of single crystal X-ray diffraction studies upon membrane model systems. *Biophys. Soc.Abstr.* 10 (1970) 499
- Inbar, M., Sachs, L.: Interaction of the carbohydrate-binding protein concanavalin A with normal and transformed cells. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 63 (1969) 1418-1425
- Inbar, M., Sachs, L.: Structural difference in sites on the surface membrane of normal and transformed cells. *Nature* 223 (1969) 710-712

- Inbar, M., Ben-Bassat, H., Sachs, L.: A specific metabolic activity on the surface membrane in malignant cell-transformation. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 68 (1971) 2748-2751
- Inbar, M., Ben-Bassat, H., Sachs, L.: Inhibition of ascites tumor development by concanavalin A. *Int.J.Cancer* 9 (1972) 143-149
- Inbar, M., Ben-Bassat, H., Sachs, L.: Difference in the mobility of lectin sites on the surface membrane of normal lymphocytes and malignant lymphoma cells. *Int.J.Cancer* 12 (1973) 93-99
- Ishihara, H., Massaro, D.J., Heath, E.C.: The metabolism of L-fucose. *J.Biol.Chem.* 243 (1968) 1103-1109
- Ishihara, H., Heath, E.C.: The metabolism of L-fucose. The biosynthesis of guanosine diphosphate L-fucose in porcine liver. *J.Biol.Chem.* 243 (1968) 1110-1115
- Isselbacher, K.J., Balko, C.: Sugar and amino acid transport by cells in culture. Differences between normal and malignant cells. *N.Engl.J.Med.* 286 (1972) 929-933
- Ito, S.: Structure and function of the glycocalyx. *Fed.Proc.* 28 (1969) 12-25
- Itzhaki, S., Wertheimer, E.: Metabolism of adipose tissue in vitro: Nutritional factors and effect of insulin. *Endocrinology* 61 (1957) 72-78
- Jabbal, J., Schachter, H.: Pork liver guanosine diphosphate-L-fucose glycoprotein fucosyltransferases. *J.Biol.Chem.* 246 (1971) 5154-5161
- Jacquez, J.A.: Transport and exchange diffusion of L-tryptophan in Ehrlich cells. *Am.J.Physiol.* 200 (1961) 1063-1068
- Jacquez, J.A.: Competitive stimulation: Further evidence for two carriers in the transport of neutral amino acids. *Biochim. Biophys.Acta* 125 (1967) 751-755
- Jacquez, J.A., Schafer, J.A.: Na^+ und K^+ electrochemical potential gradients and the transport of α -aminoisobutyric acid in Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim.Biophys.Acta* 193 (1969) 368-383
- Jardetzky, O.: Simple allosteric model for membrane pumps. *Nature* 211 (1966) 969-970
- Johnstone, R.M.: Transport of amino acids in Ehrlich ascites cells and mouse pancreas. In: Na-linked transport of organic solutes, S.51-67, Ed.: Heinz, E., Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1972
- Jones, C.T., Lanks, P.: Increased incorporation of L- ^{14}C valine into proteins of the nuclear fraction from guinea-pig brain slices incubated with ouabain. *Biochem.J.* 114 (1969) 62P

- Jullien, M., Blat, C., Harel, L.: Effect of pH and serum on phosphate transport in BHK₂₁ and BHK₂₁-polyoma transformed cells. *Exp.Cell Res.* 73 (1972) 530-533
- Jung, C.Y., Carlson, L.M., Whaley, D.A.: Glucose transport carrier activities in extensively washed human red cell ghosts. *Biochim.Biophys.Acta* 241 (1971) 613-627
- Jungas, R.L.: Role of cyclic-3,5-AMP in the response of adipose tissue to insulin. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 56 (1966) 757-763
- Jungas, R.L., Ball, E.G.: Studies on the metabolism of adipose tissue. XII. The effects of insulin and epinephrine on free fatty acid and glycerole production in the presence and absence of glucose. *Biochemistry* 2 (1963) 383-388
- Kaback, H.R., Kostellow, A.B.: Glycine uptake in *escherichia coli*. *J.Biol.Chem.* 243 (1968a) 1384-1390
- Kaback, H.R., Stadtman, E.R.: Glycine uptake in *escherichia coli*. *J.Biol.Chem.* 243 (1968b) 1390-1400
- Kabat, E.A.: In: Blood group substances. Their chemistry and immunochemistry, S.47, Academic Press Inc., New York 1956
- Kalckar, H.M., Ullrey, D., Kijomoto, S., Hakomori, S.: Carbohydrate catabolism and the enhancement of uptake of galactose in hamster cells transformed by polyoma virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 70 (1973) 839-843
- Kaplan, D.M., Criddle, R.S.: Membrane structural proteins. *Physiol.Rev.* 51 (1971) 249-272
- Kather, H., Rivera, M., Brand, K.: Interrelationship and controll of glucose metabolism and lipogenesis in isolated fat-cells. *Biochem.J.* 128 (1972) 1097-1102
- Kavanau, J.L.: Membrane structure and function. *Fed.Proc.* 25 (1966) 1096-1107
- Kennedy, C.T.C., Cater, D.B., Hartveit, F.: Protection of C3H mice against BP 8 tumour by RNA extracted from lymph-nodes and spleens of specifically sensitized mice. *Acta Pathol. Microbiol.Scand.* 77 (1969) 196-200
- Kipnis, D.M., Noall, M.W.: Stimulation of amino acid transport by insulin in the isolated rat diaphragm. *Biochim.Biophys. Acta* 28 (1958) 226-227
- Klein, E.: The cell surface in immune response. *Eur.J.Cancer* 6 (1970) 15-22
- Kohn, A., Fuchs, P.: Communication in cell communities. *Curr.Top. Microbiol.Immunol.* 52 (1970) 94-141
- Kolber, A.R., LeFevre, P.G.: Evidence for carrier-mediated transport of monosaccharides in the Ehrlich ascites tumor cell. *J.Gen.Physiol.* 50 (1967) 1907-1928

- Kolodny, G.M.: Evidence for transfer of macromolecular RNA between mammalian cells in culture. *Exp.Cell Res.* 65 (1971) 313-324
- Kono, T.: Destruction of insulin effector system of adipose tissue cells by proteolytic enzymes. *J.Biol.Chem.* 244 (1969) 1772-1778
- Korn, E.D.: Structure of biological membranes. *Science* 153 (1966) 1491-1498
- Kornfeld, S., Rogers, J., Gregory, W.: The nature of the cell surface receptor site for lens culinaris phytohemagglutinin. *J.Biol.Chem.* 246 (1971) 6581-6586
- Krahl, M.E.: The effect of insulin and pituitary hormones on glucose uptake in muscle. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 54 (1951) 649-670
- Kromphardt, H., Grobecker, H., Ring, K., Heinz, E.: Über den Einfluß von Alkali-Ionen auf den Glycintransport in Ehrlich-Ascites-Tumorzellen. *Biochim.Biophys.Acta* 74 (1963) 549-551
- Krug, U., Krug, F., Cuatrecasas, P.: Emergence of insulin receptors on human lymphocytes during in vitro transformation. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 69 (1972) 2604-2608
- Kuchler, R.J.: The role of sodium and potassium in regulating amino acid accumulation and protein synthesis in LM-strain mouse fibroblasts. *Biochim.Biophys.Acta* 136 (1967) 473-483
- Kuhn, R., Löw, J.: Über Protoäscigenin, die Stammsubstanz der Ascine. *Liebigs Ann.Chem.* 669 (1963) 183-188
- Kuo, J.F., Holmlund, C.E., Dill, J.K.: The effect of proteolytic enzymes on isolated adipose cells. *Life Sci.* 5 (1966) 2257-2262
- Kuo, J.F., Dill, J.K., Holmlund, C.E.: Inhibition by phlorizin of insulin- and protease-stimulated glucose utilization in isolated adipose cells. *Biochim.Biophys.Acta* 144 (1967a) 252-258
- Kuo, J.F., Dill, J.K., Holmlund, C.E.: Effects of arsenite on lipolysis and metabolism of glucose, palmitic acid and amino acids by isolated adipose cells. *Biochim.Biophys.Acta* 148 (1967b) 683-688
- Kuo, J.F.: Stimulation of glucose utilization and inhibition of lipolysis by polyene antibiotics in isolated adipose cells. *Arch.Biochem.Biophys.* 127 (1968) 406-412
- Lähoda, F.: Echoenzephalographische Untersuchungen zur Wirksamkeit von Aescin beim Hirnödem. *Ärztliche Praxis* 23 (1971) 1227-1229
- Lamb, J.F., McCall, D.: The effects of prolonged treatment with ouabain on Na, K and Ca levels in cultered cells. *J.Physiol.* 206 (1970) 33P-34P

- Lee, A.G., Birdsall, N.J.M., Metcalfe, J.C.: NMR studies of biological membranes. *Chem.Brit.* 9 (1973) 116-123
- Lefevre, P.G.: Sugar transport in the red blood cell: Structure-activity relationships in substrates and antagonists. *Pharmacol.Rev.* 13 (1961) 39-70
- Lefevre, P.G.: Transport of carbohydrates by animal cells. In: *Metabolic pathways Vol.VI. Metabolic transport*, S.385-454, Ed.: Hokin, L.E., Academic Press, New York, London 1972
- Lehninger, A.L.: Acid-base changes in mitochondria and medium during energy-dependent binding of Ca^{++} . *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 147 (1969) 816-823
- Lenard, J., Singer, S.J.: Protein conformation in cell membrane preparation as studied by optical rotatory dispersion and circular dichroism. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 56 (1966) 1828-1835
- Lenard, J., Singer, S.J.: Structure of membranes: reaction of red blood cell membranes with phospholipase C. *Science* 159 (1968) 738-739
- Levine, R., Goldstein, M., Klein, S., Huddlestun, B.: The action of insulin on the distribution of galactose in eviscerated nephrectomized dogs. *J.Biol.Chem.* 179 (1949) 985-986
- Levine, R., Goldstein, M., Huddlestun, B., Klein, S.P.: Action of insulin on the "permeability" of cells to free hexoses, as studied by its effect on the distribution of galactose. *Am.J.Physiol.* 163 (1950) 70-76
- Levine, Y.K., Wilkins, M.H.F.: Structure of oriented lipid bilayers. *Nature (New Biol.)* 230 (1971) 69-76
- Lieb, W.R., Stein, W.D.: Quantitative predictions of a noncarrier model for glucose transport across the human red cell membrane. *Biophys.J.* 10 (1970) 585-609
- Lieb, W.R., Stein, W.D.: New theory for glucose transport across membranes. *Nature (New Biol.)* 230 (1971) 108-109
- Lieb, W.R., Stein, W.D.: Carrier and non-carrier models for sugar transport in the human red blood cell. *Biochim.Biophys. Acta* 265 (1972) 187-207
- Lineweaver, H., Burk, D.: The determination of enzyme dissociation constants. *J.Am.chem.Soc.* 56 (1934) 658-666.
- Loeschke, K., Baumann, K., Renschler, H., Ullrich, K.J.: Differenzierung zwischen aktiver und passiver Komponente des D-Glukosetransports am proximalen Konvolut der Rattenniere. *Pfluegers Arch.* 305 (1969) 118-138
- Lorenz, D., Marek, M.L.: Das therapeutisch wirksame Prinzip der Roßkastanie (*Aesculus hippocastanum*) I. Aufklärung des Wirkstoffes. *Arzneim.Forsch.* 10 (1960) 263-272

- Löw, J.: Über Acylwanderungen bei Protoöscigeninestern. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 348 (1967) 839-842
- Lowe, A.G.: Enzyme mechanism for the active transport of sodium and potassium ions in animal cells. Nature 219 (1968) 934-936
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. J.Biol. Chem. 193 (1951) 265-275
- Lowry, D.R., Rowe, W.P., Teich, N., Hartley, J.W.: Murine leukemia virus: High-frequency activation in vitro by 5-jododeoxyuridine and 5-bromodeoxyuridine. Science 174 (1971) 155-156
- Lubin, M.: Intracellular potassium and macromolecular synthesis in mammalian cells. Nature 213 (1967) 451-453
- Lucy, J.A.: Globular lipid micells and cell membranes. J.Theor. Biol. 7 (1964) 360-373
- Lucy, J.A.: Structure and assembly of macromolecular lipid complexes composed of globular micelles. J.Mol.Biol. 8 (1964) 727-748
- Lucy, J.A.: Theoretical and experimental models for biological membranes. In: Biological Membranes, Vol.1, S.233-288, Ed.: Chapman, D., Academic Press, London, New York 1968
- Luft, J.H.: Electron microscopy of cell extraneous coats as revealed by ruthenium red staining. J.Cell Biol. 23 (1964) 54A-55A
- Luft, J.H.: Fine structure of capillary and endocapillary layer as revealed by ruthenium red. Fed.Proc. 25 (1966) 1773-1783
- Luft, J.H.: Ruthenium red and violet. 1.Chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanism of action. Anat.Rec. 171 (1971) 347-368
- Maekawa, A., Nakamura, T., Kojima, K.: Electrokinetic properties of Yoshida sarcoma cells treated with antibodies. Gann 62 (1971) 69-76
- Maizels, M.: Calcium ions and the permeability of human red cells. Nature 184 (1959) 366
- Mallucci, L., Poste, G.H., Wells, V.: Synthesis of cell coat in normal and transformed cells. Nature (New Biol.) 235 (1972) 222-223
- Manery, J.F.: Effects of Ca ions on membranes. Fed.Proc. 25 (1966) 1804-1810
- Marcante, M.L.: Isolamento e purificazione della α_1 -Glicoproteina dal tumore ascite di Yoshida. Boll.Soc.Ital.Biol.Sper. 39 (1963) 56-58

- Martinez-Palomo, A., Brailovski, C.: Surface layer in tumor cells transformed by adeno-12- and SV 40 viruses. *Virology* 34 (1968) 379-382
- Martinez-Palomo, A., Wicker, R., Bernhard, W.: Ultrastructural detection of concanavalin surface receptors in normal and in polyoma-transformed cells. *Int.J.Cancer* 9 (1972) 676-684
- Mayhew, E., Weiss, L.: Ribonucleic acid at the periphery of different cell types, and effect of growth rate on ionogenic groups in the periphery of cultured cells. *Exp.Cell Res.* 50 (1968) 441-453
- McAllister, R.M., Nicolson, M., Gardner, M.B., Rongey, R.W., Rasheed, S., Sarma, P.S., Huebner, R.J., Hatanaka, M., Oroszlan, S., Gilden, R.V., Kabigting, A., Vernon, L.: C-type virus released from cultured human rhabdomyosarcoma cells. *Nature (New Biol.)* 235 (1972) 3-6
- McNutt, N.S., Hershberg, R.A., Weinstein, R.S.: Further observations on the occurrence of nexus in benign and malignant human cervical epithelium. *J.Cell Biol.* 51 (1970) 805-825
- Meadows, P.S.: Bacteria as cell surface markers on normal and malignant mammalian cells. *Experientia* 27 (1971) 1321-1322
- Merishi, J.N.: Positively charged amino groups on the surface of normal and cancer cells. *Eur.J.Cancer* 6 (1970) 127-137
- Merishi, J.N.: Surface molecular components of Ehrlich ascites tumour cells. *Blut* 24 (1972) 388-397
- Merz, D.C., Good, R.A., Litman, G.W.: Seregation of membrane components using isoelectric focusing in polyacrylamide gels. *Biochim.Biophys.Res.Comm.* 49 (1972) 84-91
- Metz, J., Eberg, W., Weicker, H.: Gaschromatographische Analyse des Protein- und Kohlenhydratanteils von Erythrozytenmembranglykoproteinen. *Clin.Chim.Acta* 34 (1971) 31-46
- Minemura, T., Crofford, O.B.: Insulin-receptor interaction in isolated fat cells. *J.Biol.Chem.* 244 (1969) 5181-5187
- Mitchell, W.M., Moses, H.L., Orth, D.N., Korinek, J.: Murine leukaemia C-type virus associated with functional murine carcinomas of endocrine origin. *Nature (New Biol.)* 231 (1971) 99-100
- Mitchell, P.: Chemiosmotic coupling in oxidative and photo-synthetic phosphorylation. *Biol.Rev.* 41 (1966) 445
- Montagnier, L.: Altérations de la surface cellulaire induites par des virus oncogènes et leur rôle dans la transformation maligne. *Bull.Cancer* 57 (1970) 13-22
- Montagnier, L.: Défectivité, démasquage et stimulation des virus oncogènes. In: Deuxième colloque international sur les virus oncogènes. C.N.R.S. (1970) 19-32

- Moore, C., Pressmann, B.C.: Mechanism of action of valinomycin on mitochondria. *Biochim.Biophys.Res.Comm.* 15 (1964) 562-567
- Moore, E.G., Temin, H.M.: Lack of correlation between conversion by RNA tumour viruses and increased agglutinability of cells by concanavalin A and wheat germ agglutinin. *Nature* 231 (1971) 117-118
- Mora, P., Cumar, F., Brady, R.: A common biochemical change in SV 40 and polyoma virus transformed mouse cells coupled to control of cell growth in culture. *Virology* 46 (1971) 60-72
- Morgan, W.D.J., Watkins, W.M.: Some aspects of the biochemistry of the human bloodgroup substances. *Brit.Med.Bull.* 15 (1959) 109-113
- Morgan, H.E., Henderson, M.J., Regen, D.M., Park, C.R.: Regulation of glucose uptake in muscle. *J.Biol.Chem.* 236 (1961) 253-261
- Morgan, H.E., Regen, D.M., Park, C.R.: Identification of a mobile carrier mediated sugar transport system in muscle. *J.Biol.Chem.* 239 (1964) 369-374
- Morgan, H.E.: Changes at the membranes of leukemia virus transformed cells and virus as detected by electron-microscopy. *Bibl.Haematol.* 36 (1970) 144-147
- Muramatsu, T., Nathenson, S.G.: Studies on the carbohydrate portion of membrane-located mouse H-2 Alloantigens. *Biochemistry* 9 (1970) 4875-4883
- Naftalin, R.J.: A model for sugar transport across red cell membranes without carriers. *Biochim.Biophys.Acta* 211 (1970) 65-78
- Narahara, H.T., Ozand, P.: Studies of tissue permeability. IX. The effect of insulin on the penetration of 3-methyl-glucose H³ in frog muscle. *J.Biol.Chem.* 238 (1963) 40-49
- Nathenson, S.G., Shimada, A., Yamane, K., Muramatsu, T., Cullen, S., Mann, D.L., Fahey, J.L., Graff, R.: Biochemical properties of papain-solubilized murine and human histocompatibility alloantigens. *Fed.Proc.* 29 (1970) 2026-2033
- Nicolson, G.L., Singer, S.J.: Ferritin-conjugated plant agglutinins as specific saccharide stains for electron microscopy: application. *Natl.Acad.Sci.USA* 68 (1971) 942-945
- Nirenberg, M.W., Hogg, J.F.: On the mode of hexose uptake by ascites tumor cells. *J.Am.Chem.Soc.* 78 (1956) 6210-6212
- Nirenberg, M.W., Hogg, J.F.: Hexose transport in ascites tumor cells. *J.Am.Chem.Soc.* 80 (1958) 4407-4412
- Ohkuma, S., Furuhashi, T.: Cation-exchange behaviour of a sialoglycopeptide released from human erythrocytes by chymotrypsin. *Proc.Japan Acad.* 46 (1970) 305-310

- Ohta, N., Pardee, A.B., McAuslan, E.R., Burger, M.M.: Sialic acid contents and controls of normal and malignant cells. *Biochim.Biophys.Acta* 158 (1968) 98-102
- O'Neill, C.H.: An association between viral transformation and Forssman antigen detected by immune adherence in cultured BHK 21 cells. *J.Cell Sci.* 3 (1968) 405-422
- Onodera, K., Sheinin, R.: Macromolecular glucosamine-containing component of the surface of cultivated mouse cells. *J.Cell Sci.* 7 (1970) 337-355
- Opit, L.J., Charnock, J.S.: A molecular model for a sodium pump. *Nature* 208 (1965) 471-474
- Oppenheimer, S.B., Edidin, M., Orr, Ch.W., Roseman, S.: An L-glutamine requirement for intercellular adhesion. *Proc. Natl.Acad.Sci.USA* 63 (1969) 1395-1402
- Oxender, D.L., Christensen, H.N.: Distinct mediating systems for the transport of neutral amino acids by the Ehrlich cell. *J.Biol.Chem.* 238 (1963) 3686-3699
- Paine, C.M., Heinz, J.: The structural specificity of the glycine transport system of Ehrlich carcinoma cells. *J.Biol.Chem.* 235 (1960) 1080-1085
- Parsons, D.F., Subjeck, J.R.: The morphology of the polysaccharide coat of mammalian cells. *Biochim.Biophys.Acta* 265 (1972) 85-113
- Pasternak, L., Pasternak, G.: Immunologische Charakterisierung von künstlich mit dem Graffi-Leukämievirus infizierten Sarkomen. II. Studien zur Differenzierung von viralen und neuen zellulären Antigenen. *Arch.Geschwulstforsch.* 32 (1968) 301-308
- Payne, L.M., Chubb, R.C.: Studies on the nature and genetic control of an antigen in normal chick embryos which reacts in the COFAL test. *J.Gen.Virol.* 3 (1968) 379-391
- Phillips, D.R., Morrison, M.: Exterior proteins on the human erythrocyte membrane. *Biochim.Biophys.Res.Comm.* 4 (1971) 1103-1108
- Pilch, Y.H., Ramming, K.P.: Transfer of tumor immunity with ribonucleic acid. *Cancer* 26 (1970) 630-637
- Plagemann, P.G.W.: Effects of phenethyl alcohol on transport reactions, nucleotide pools, and macromolecular synthesis in Nivikoff rat hepatoma cells growing in suspension culture. *J.Cell.Physiol.* 75 (1970) 315-327
- Poole, D.T., Butler, Th.C., Williams, M.E.: The effects of nigericin, valinomycin, and 2,4-dinitrophenol on intracellular pH, glycolysis, and K⁺ concentration of Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim.Biophys.Acta* 266 (1972) 463-470

- Poretz, R.D., Goldstein, I.J.: An examination of the topography of the saccharide binding sites of concanavalin A and of the forces involved in complexation. *Biochemistry* 9 (1970) 2890-2896
- Post, R.L., Sen, A.K., Rosenthal, A.S.: A phosphorylated intermediate in adenosine triphosphate-dependent sodium and potassium transport across kidney membranes. *J.Biol.Chem.* 240 (1965) 1437-1445
- Potashner, S.J., Johnstone, R.M.: Cations, transport and exchange diffusion of methionine in Ehrlich ascites cells. *Biochim. Biophys.Acta* 203 (1970) 445-456
- Potashner, S.J., Johnstone, R.M.: Cation gradients, ATP and amino acid accumulation in Ehrlich ascites cells. *Biochim. Biophys.Acta* 233 (1971) 91-103
- Poulik, M.D., Lauf, P.K.: Some physico-chemical and serological properties of isolated protein components of red cell membranes. *Clin.Exp.Immunol.* 4 (1969) 165-175
- Priori, E.S., Dmochowski, L., Myers, B., Wilbur, J.R.: Constant production of type C virus particles in a continuous tissue culture derived from pleural effusion cells of a lymphoma patient. *Nature (New Biol.)* 232 (1971) 61-62
- Prives, C., Quastel, J.H.: Effects of cerebral stimulation on the biosynthesis in vitro of nucleotides and RNA in brain. *Nature* 221 (1969) 1053
- Racker, E.: In: *Mechanisms in Bioenergetics*, S.11, Academic Press New York 1965
- Racker, E.: *Bioenergetics and the problem of tumor growth.* *Am.Scient.* 60 (1972) 56-63
- Raff, M.C., De Petris, S.: Movement of lymphocyte surface antigens and receptors: the fluid nature of the lymphocyte plasma membrane and its immunological significance. *Fed. Proc.* 32 (1973) 48-54
- Rambourg, A., Neutra, M., Leblond, C.P.: Presence of a "cell coat" rich in carbohydrate at the surface of cells in the rat. *Anat.Rec.* 154 (1966) 41-72
- Rambourg, A., Leblond, C.P.: Electron microscope observation on the carbohydrate-rich cell coat present at the surface of cells in the rat. *J.Cell Biol.* 32 (1967) 27-53
- Rasmussen, H., Nagata, N.: Renal gluconeogenesis: effect of parathyroid hormone and dibutyryl 3', 5' - AMP. *Biochim. Biophys.Acta* 215 (1970) 17-28
- Reith, A., Oftebro, R., Seljelid, R.: Incorporation of ^3H -glucosamin in Hela cells as revealed by light and electron microscopic autoradiography. *Exp.Cell Res.* 59 (1970) 167-170

- Resch, K., Imm, W., Ferber, E., Wallach, D.F.H., Fischer, H.: Quantitative determination of soluble and membrane proteins through their native fluorescence. *Naturwissenschaften* 58 (1971) 220
- Revel, J.P.: A stain for the ultrastructural localization of acid mucopolysaccharides. *J.Microscopie* 3 (1964) 535-544
- Rhim, J.S., Lengel, C.R., Cho, H.Y., Takemoto, K.K., Turner, H.C., Huebner, R.J., Gilden, R.V.: Expression of a new complement fixing antigen reactive with murine sarcoma virus rat anti-serum in rat cells transformed by polyoma virus. *Nature (New Biol.)* 235 (1972) 188-190
- Richter, M.N., McDowell, E.C.: Studies on mouse leukemia. VII. The relation of cell death to the potency of inoculated suspensions. *J.Exp.Med.* 57 (1933) 1-20
- Rieser, P., Rieser, C.H.: Anabolic responses of diaphragm muscle to insulin and to other pancreatic proteins. *Proc. Soc.Exp.Biol.Med.* 116 (1964) 669-671
- Riggs, T.R., Walker, L.M., Christensen, H.N.: Potassium migration and amino acid transport. *J.Biol.Chem.* 233 (1958) 1479-1484
- Robbins, E., Pedderston, T., Klein, P.: Comparison of mitotic phenomena and effects induced by hypertonic solutions in Hela cells. *J.Cell Biol.* 44 (1970) 400-416
- Robertson, J.D.: New observations on the ultrastructure of the membranes of frog peripheral nerve fibers. *J.Biophys. Biochem.Cytol.* 3 (1957) 1043-1047
- Robertson, H.T., Black, P.H.: Changes in surface antigens of SV40-virus transformed cells. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 130 (1969) 363-370
- Rodbell, M.: Metabolism of isolated fat cells I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J.Biol.Chem.* 239 (1964) 375-384
- Rodbell, M., Jones, A.B.: Metabolism of isolated fat cells III. The similar inhibitory action of phospholipase C and of insulin on lipolysis stimulated by lipolytic hormones and theophyllin. *J.Biol.Chem.* 241 (1966) 140-143
- Roe, J.H.: The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthron reagent. *J.Biol.Chem.* 212 (1955) 335-343
- Rosenberg, S.A., McIntosh, J.R.: Erythrocyte membranes: effects of sonication. *Biochim.Biophys.Acta* 163 (1968) 285-289
- Rosenberg, S.A., Guidotti, G.: The protein of human erythrocyte membranes. I.Preparation, solubilization, and partial-characterization. *J.Biol.Chem.* 243 (1968) 1985-1992

- Rosenberg, S.A., Guidotti, G.: In: The red cell membrane, S.93.
Eds.: Jamieson, G.A., Greenwalt, T.J., Lippincott Co,
Philadelphia 1969
- Rossi, G.B., Cudkowicz, G., Friend, C.: Evidence for transformation of spleen cells one day after infection of mice with Friend leukemia virus. J.Exp.Med. 131 (1970) 765-781
- Roth, J., Stiller, D., Bolck, F.: Glycocalyx of tumor cells. Exp.Pathol. 6 (1972a) 35-46
- Roth, J., Meyer, H.W., Bolck, F., Stiller, D.: Electron microscopic visualization of carbohydrate components in the glycocalyx of tumor cells using concanavalin A. Exp.Pathol. 6 (1972b) 189
- Roth, J., Meyer, H.W., Neupert, G., Bolck, F.: Concanavalin A binding sites in the plasma membrane of normal cells, spontaneously transformed cells and tumor cells as visualized by electron microscopy. Exp.Pathol. 8 (1973) 19-30
- Rubin, R.P.: In: Calcium and the secretory process, S.20-23, Plenum Press New York, London 1974
- Ruhenstroth-Bauer, G., Fuhrmann, G.F.: Die negative Überschlußladung der Membran von normalen, proliferierenden und malignen Leberzellen der Ratte. Z.Naturforsch. 16b (1961a) 252
- Ruhenstroth-Bauer, G., Kubler, W., Fuhrmann, G.F., Rueff, F.: Zur Frage spezifischer Strukturelemente in Tumorzellmembranen: ihr Neuraminsäuregehalt. Klin.Wochenschr. 39 (1961b) 764-765
- Ruhenstroth-Bauer, G., Fuhrmann, G.F., Granzer, E., Kübler, W., Rueff, F.: Elektrophoretische Untersuchungen an normalen und malignen Zellen. Naturwissenschaften 49 (1962) 363-368
- Russel, J.M., Blaustein, M.P.: Calcium efflux from barnacle muscle fibers: dependence on external cations. J.Gen.Physiol. 63 (1974) 144-167
- Saha, J., Lopez-Mondragon, R., Narahara, H.T.: Effect of epinephrine on permeability to sugar and on the production of free glucose in skeletal muscle. J.Biol.Chem. 243 (1968) 521-527
- Sakiyama, H., Robbins, P.W.: Glycolipid synthesis and tumorigenicity of clones isolated from the Nil 2 line of hamster embryo fibroblasts. Fed.Proc. 32 (1973) 86-90
- Samson, A.C.R., Holland, J.B.: Envelope protein changes in mutants of escherichia coli refractory to colicin E 2. Febs Letters 11 (1970) 33-36
- Schachter, H., Sarney, J., McGuire, J., Roseman, S.: Isolation of diphosphopyridine nucleotide-dependent L-fucose dehydrogenase from pork liver. J.biol.Chem. 244 (1969) 4785-4792

- Schachter, H., Jabal, J., Hudgin, R.L., Printeric, L.: Intracellular localization of liver sugar nucleotide glycoprotein glycosyltransferases in a golgi-rich fraction. *J.Biol.Chem.* 245 (1970) 1090-1100
- Schäfer, A.: Intranukleäre virusähnliche Partikeln in einem Mamma-Karzinom. *Experientia* 25 (1969) 729-752
- Schäfer, W.: Onkogene Viren - Ein Überblick. *Zentralbl. Bakteriol.* 220 (1972) 3-26
- Schafer, J.A., Jacquez, J.A.: Evidence against the sodium-gradient hypothesis for amino acid transport in the Ehrlich ascites cells. *Fed.Proc.* 27 (1968) 516
- Schafer, J.A., Heinz, E.: The effect of reversal of Na^+ and K^+ electrochemical potential gradients on the active transport of amino acids in Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim. Biophys.Acta* 249 (1971) 15-33
- Schnaitman, C.A.: Comparison of rat liver mitochondrial and microsomal membrane proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 63 (1969) 412-419
- Schnebli, H.P.: A protease-like activity associated with malignant cells. *Schweiz.Med.Wochenschr.* 102 (1972) 1194-1197
- Schnebli, H.P.: Die Rolle der Plasmamembran in der malignen Transformation. *Helv.Med.Acta* 36 (1972) 371-384
- Schulemann, W.: Über Vitalfärbung. *Z.Ang.Chem.* 34 (1921) 237-239
- Schultz, S.G., Curran, P.F.: Coupled transport of sodium and organic solutes. *Physiol.Rev.* 50 (1970) 637-718
- Schultz, St.G., Zagylsky, R.: Interactions between active sodium transport and active amino-acid transport in isolated rabbit ileum. *Nature* 205 (1965) 292-294
- Scott, R.E., Marchesi, V.T.: Structural changes in membranes of transformed lymphocytes demonstrated by freeze-etching. *Cell.Immunol.* 3 (1972) 301-317
- Seeman, P., Cheng, D., Iles, G.H.: Structure of membrane holes in osmotic and saponin hemolysis. *J.Cell Biol.* 56 (1973) 519-527
- Segal, S., Topper, Y.J.: On the biosynthesis of L-fucose by aerobacter aerogenes. *Biochim.Biophys.Acta* 25 (1957) 419-420
- Segal, S., Topper, Y.J.: On the biosynthesis of fucose and L-fucose metabolism in man. *Biochim.Biophys...* 2 (1960)
- Seiji, M., Itakura, H.: Effect of desoxycholate on smooth-surface membranes. *Tohoku J.Exp.Med.* 107 (1971) 149-157

- Senft, G., Schultz, G., Munske, K., Hoffmann, M.: Influence of insulin on cyclic 3,5-AMP phosphodiesterase activity in liver, skeletal muscle, adipose tissue, and kidney. *Diabetologia* 4 (1968) 322-329
- Seyderhelm: Die Prüfung der Vitalität isolierter Zellen mittels kolloidaler Farbstoffe. *Dtsch.Med.Wochenschr.* 51 (1925) 180-181
- Sheppard, J.R., Levine, A.J., Burger, M.M.: Cell-surface changes after infection with oncogenic viruses: requirement for synthesis of host DNA. *Science* 172 (1971) 1345-1346
- Sherbet, G.V., Lakshmi, M.S., Rao, K.V.: Characterisation of ionogenic groups and estimation of the net negative electric charge on the surface of cells using natural pH-gradients. *Exp.Cell Res.* 70 (1972) 113-123
- Sherbet, G.V., Lakshmi, M.S.: Measurement of surface charge of intact cells using a natural pH gradient. *Annu.Rep.Brit. Emp.Cancer Camp.Res.* (1969) 92
- Shimada, A., Nathenson, S.G.: Murine histocompatibility-2(H-2) alloantigens purification, and some chemical properties of soluble products from H-2^b and H-2^d genotypes released by papain digestion of membrane fractions. *Biochemistry* 8 (1969) 4048-4062
- Shipley, G.G.: Recent X-ray diffraction studies of biological membranes and membrane components. In: *Biological membranes Vol.2, S.1-89.* Ed.: Chapman, D., Wallach, D.F.H., Academic Press, London, New York 1973
- Siering, H.: Die Permeabilität von Zellmembranen für Ionen unter dem Einfluß von Aescin. *Arzneim.Forsch.* 12 (1962) 376-378
- Siering, H.: Permeabilitätsuntersuchungen am Ehrlichschen Mäuse-Ascites-Carcinom. *Naturwissenschaften* 49 (1962) 63
- Siering, H.: Permeabilitätsbeeinflussungen des Ehrlichschen Mäuse-Ascites-Carcinom. *Naturwissenschaften* 49 (1962) 499
- Siering, H.: Die Temperaturabhängigkeit der Permeabilitätswirkung des Aescins. *Naturwissenschaften* 49 (1962) 543
- Siering, H.: Aescinwirkungen auf das Ehrlichsche Mäuse-Ascites-Carcinom. *Naturwissenschaften* 51 (1964) 272
- Simon-Reuss, I., Cook, G.M.W., Seaman, G.V.F., Heard, D.H.: Electrophoretic studies on some types of mammalian tissue cell. *Cancer Res.* 24 (1964) 2038-2043
- Singer, S.J., Nicolson, G.L.: The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Cell membranes are viewed as two-dimensional solutions of oriented globular proteins and lipids. *Science* 175 (1972) 720-731

- Siskind, G.W., Benacerraf, B.: Cell selection by antigen in the immune response. *Adv.Immunol.* 10 (1969) 1-50
- Sjöstrand, F.S.: A new ultrastructural element of the membranes in mitochondria and of some cytoplasmic membranes. *J.Ultrastruct.Res.* 9 (1963a) 340-361
- Sjöstrand, F.S.: A comparison of plasma membrane cytomembranes, and mitochondrial elements with respect to ultrastructural features. *J.Ultrastruct.Res.* 9 (1963b) 561-580
- Sjöstrand, F.S.: Molecular structure and function of cellular membranes. In: *Regulatory functions of biological membranes*, S.1-20. Ed.: Järnefelt, J., Elsevier Publishing Company Amsterdam, London, New York 1968
- Skou, J.C.: The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim.Biophys.Acta* 23 (1957) 394-401
- Skou, J.C.: Enzymatic basis for active transport of Na^+ and K^+ across cell membrane. *Physiol.Rev.* 45 (1965) 596-617
- Smets, L.A., Broekhuysen-Davies, J.: Shielding of antigens and concanavalin A agglutination sites by a surface coat of transplantable mouse lymphosarcoma cells. *Eur.J.Cancer* 8 (1972) 541-548
- Smith, C.W., Hollers, J.C.: The pattern of binding of fluorescein-labeled concanavalin A to the motile lymphocyte. *J.Reticuloendothel.Soc.* 8 (1970) 458-464
- So, L.L., Goldstein, I.J.: Protein-carbohydrate interaction. IX. Application of the quantitative hapten inhibition technique to polysaccharide-concanavalin A interaction. Some comments on the forces involved in concanavalin A-polysaccharide interaction. *J.Immunol.* 99 (1967) 158-163
- So, L.L., Goldstein, I.J.: Protein-carbohydrate interaction. XX. On the number of combining sites on concanavalin A, the phytohemagglutinin of the jack bean. *Biochim.Biophys.Acta* 165 (1968) 398-404
- Stark, G., Benz, R.: The transport of potassium through lipid bilayer membranes by the neutral carriers valinomycin and monactin. *J.Membr.Biol.* 5 (1971) 133-153
- Stobo, J.D., Rosenthal, A.S.: Biologically active concanavalin A complexes suitable for light and electron microscopy. *Exp. Cell Res.* 70 (1972) 443-447
- Stoker, M.G.P., Shearer, M., O'Neill, C.: Growth inhibition of polyoma-transformed cells by contact with static normal fibroblast. *J.Cell Sci.* 1 (1966) 297-310
- Stoker, M.G.P.: Regulation of growth and orientation in hamster cells transformed by polyoma virus. *Virology* 24 (1964) 165-171

- Stone, A.J.: A proposed model for the Na⁺ pump. *Biochim. Biophys. Acta* 150 (1968) 578-586
- Stryer, L.: The interaction of a naphthalene dye with apomyoglobin and apohemoglobin. A fluorescent probe of non-polar binding sites. *J. Mol. Biol.* 13 (1965) 482-495
- Tanaka, S.C.M.: Joint action of herpes simplex virus and 3-methylcholanthrene in production of papillomas in mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 34 (1965) 441-451
- Temin, H.M.: The mechanism of carcinogenesis by avian sarcoma viruses. I. Cell multiplication and differentiation. *J. Natl. Cancer Inst.* 35 (1965) 679-693
- Temin, H.M.: Studies on carcinogenesis by avian sarcoma viruses. VI. Differential multiplication of uninfected and of converted cells in response to insulin. *J. Cell. Physiol.* 69 (1967) 377-384
- Temin, H.M.: Studies on carcinogenesis by avian sarcoma viruses. VIII. Glycolysis and cell multiplication. *Int. J. Cancer* 3 (1968) 273-282
- Temin, H.M.: Altered properties of Fujinami-virus infected duck cells and murine sarcoma virus-infected rat cells. *Int. J. Cancer* 3 (1968) 491-503
- Temin, H.M.: Malignant transformation of cells by viruses. *Perspect. Biol. Med.* 14 (1970) 11-26
- Temin, H.M.: The provirus hypothesis: Speculations on the significance of RNA-directed DNA synthesis for normal development and for carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* 46 (1971) III-VII
- Temin, H.M.: Mechanism of cell transformation by RNA tumor viruses. *Annu. Rev. Microbiol.* 25 (1971) 609-648
- Tevethia, S.S., Lowry, S., Rawls, W.E., Melnick, J.L., McMillan, V.: Detection of early cell surface changes in herpes simplex virus infected cells by agglutination with concanavalin A. *J. Gen. Virol.* 15 (1972) 93-97
- Todaro, G.J., Zeve, V., Aaronson, S.: Virus in cell culture derived from human tumor patients. *Nature* 226 (1970) 1047-1049
- Todaro, G.J., Huebner, R.J.: N.A.S. Symposium: New evidence as the basis for increased efforts in cancer research. The viral oncogene hypothesis: New evidence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69 (1972) 1009-1015
- Tomita, M., Osawa, T., Sakurai, Y., Ukita, T.: On the surface structure of murine ascites tumors. I. Interactions with various phytoagglutinins. *Int. J. Cancer* 6 (1970) 283-289

- Torpiér, G., Montagnier, L.: Ultrastructural changes of the surface of BHK 21/13 transformed cells, depending on adenine nucleotides. *Int.J.Cancer* 6 (1970) 529-535
- Träuble, H.: Phasenumwandlungen in Lipiden. Mögliche Schaltprozesse in biologischen Membranen. *Naturwissenschaften* 58 (1971) 277-284
- Tschesche, R., Axen, U., Snatzke, G.: Die Konstitution des Äscins. *Liebig's Ann.Chem.* 669 (1963) 171-182
- Uebel, H., Patt, P.: Das therapeutisch wirksame Prinzip der Roßkastanie. *Arzneim.Forsch.* 10 (1960) 280-284
- Vaage, J.: Nonvirus-associated antigens in virus-induced mouse mammary tumors. *Cancer Res.* 28 (1968) 2477-2483
- Vassar, P.: The electric charge density of human tumour surfaces. *Lab.Invest.* 12 (1963) 1072-1077
- Venuta, S., Rubin, H.: Sugar transport in normal and Rous sarcoma virus-transformed chick-embryo fibroblasts. *Proc. Natl.Acad.Sci.USA* 70 (1973) 653-657
- Veselý, P.: Tumour cell surface specialization in the uptake of nutrients evidenced by cinemicrography as a phenotypic condition for density independent growth. *Folia Biol. (Praha)* 18 (1972) 395-401
- Vesterberg, O., Svenson, H.: Isoelectric fractionation, analysis, and characterization of ampholytes in natural pH-gradients. *Acta Chem.Scand.* 20 (1966) 820-834
- Vicker, M.G., Edwards, J.G.: The effect of neuraminidase on the aggregation of BHK 21 cells and BHK 21 cells transformed by polyoma virus. *J.Cell Sci.* 10 (1972) 759-768
- Vigdahl, R.L., Marquis, N.R., Tavormina, P.A.: Platelet aggregation. II. Adenylcyclase, prostaglandin E₁ and calcium. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 37 (1969) 409-415
- Vogel, G., Uebel, H.: Das therapeutisch wirksame Prinzip der Roßkastanie. III. Zur Frage von Angriffspunkt und Wirkungsmechanismus. *Arzneim.Forsch.* 10 (1960) 275
- Vogel, G., Marek, M.L.: Zur Pharmakologie einiger Saponine. *Arzneim.Forsch.* 12 (1962) 815-825
- Vogel, G., Marek, M.L., Oertner, R.: Untersuchungen zum Mechanismus der therapeutischen und toxischen Wirkung des Roßkastanien-Saponins Äscin. *Arzneim.Forsch.* 20 (1970) 699-703

- Vogt, P.K., Sarma, P.S., Huebner, R.: Presence of avian tumour virus group-specific antigen in non-producing Rous sarcoma cells of the chicken. *Virology* 27 (1965) 233
- Vorbrodt, A., Koprowski, H.: Ruthenium red-stained coat of normal and simian virus 40-transformed cells. *J.Natl. Cancer Inst.* 43 (1969) 1241-1248
- Wagner, J., Bosse, J.: Über Inhaltsstoffe des Roßkastanien-samens. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem.* 320 (1960) 27-34
- Wagner, J., Hoffmann, H., Löw, I.: Über Inhaltsstoffe des Roßkastaniensamens. IV. Die Acyloglyka der Äscine. *Tetrahedron Letters* (London) (1968) 4387
- Wagner, J., Schlemmer, W., Hoffmann, H.: Über Inhaltsstoffe des Roßkastaniensamens. IX. Struktur und Eigenschaften der Triterpenglykoside. *Arzneim.Forsch.* 20 (1970) 205-209
- Wagner, J., Hoffmann, H., Löw, I.: Über Inhaltsstoffe des Roßkastaniensamens. VIII. Die Acylglyka des Kryptoäscins und α -Äscins. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem.* 351 (1970) 1133-1140
- Wallach, D.F.H., Eylar, E.H.: Sialic acid in the cellular membranes of Ehrlich ascites-carcinoma cells. *Biochim. Biophys.Acta* 52 (1961) 594-596
- Wallach, D.F.H., Kamat, V.P., Seil, M.H.: Physicochemical differences between fragments of plasma membrane and endoplasmic reticulum. *J.Cell Biol.* 30 (1966) 601-621
- Wallach, D.F.H., Zahler, P.H.: Protein conformations in cellular membranes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 56 (1966) 1552-1559
- Warburg, O., Wind, F., Negelein, E.: Über den Stoffwechsel von Tumoren im Körper. *Klin.Wochenschr.* 5 (1926) 829-832
- Warburg, O.: In: The metabolism of tumours. London, Constable 1930
- Warren, L.: The thiobartitric acid assay of sialic acids. *J.Biol.Chem.* 234 (1959) 1971-1975
- Warren, L., Fuhrer, J.P., Buck, C.A.: Surface glycoproteins of cells before and after transformation by oncogenic viruses. *Fed.Proc.* 32 (1973) 80-85
- Watkins, W.M., Zarnitz, A.L., Wabst, E.A.: Development of I activity by human blood-group B substance treated with coffee bean α -galactosidase. *Nature* 195 (1962) 1204-1206
- Watkins, W.M.: Blood-group substances. *Science* 152 (1966) 172-181

- Weimer, H.F., Mehl, J.N., Winzler, R.J.: Studies on the mucoproteins of human plasma. *J.Biol.Chem.* 185 (1950) 561-568
- Weiss, L.: Studies on cell deformability. I. Effect of surface charge. *J.Cell Biol.* 26 (1965) 735-739
- Weiss, L., Mayhew, E.: Presence of ribonucleic acid within the peripheral zones of two types of mammalian cell. *J.Cell Physiol.* 68 (1966) 345-359
- Weiss, L., Mayhew, E.: RNA within the cellular peripheral zone and the binding of calcium to ionogenic sites. *J.Cell. Physiol.* 69 (1967) 281-282
- Weiss, L., Mayhew, E.: Ribonuclease-susceptible charged groups at the surface of Ehrlich ascites tumour cells. *Int.J.Cancer* 4 (1969) 626-635
- Weiss, L., Hauschka, T.S.: Malignancy, electrophoretic mobilities and sialic acids at the electrokinetic surface of TA₃ cells. *Int.J.Cancer* 6 (1971) 270-274
- Weiss, L., Zeigel, R.: Heterogeneity of anionic sites at the electrokinetic surfaces of Ehrlich ascites tumour cells. *J.Theor.Biol.* 34 (1972) 21-27
- Weiss, L.; Jung, O.S., Zeigel, R.: The topography of some anionic sites at the surfaces of fixed Ehrlich ascites tumor cells. *Int.J.Cancer* 9 (1972) 48-56
- Weiss, L.S., Narahara, H.T.: Regulation of cell membrane permeability in skeletal muscle. *J.biol.Chem.* 244 (1969) 3084-3091
- Weiss, R.A.: The host range of bryan strain Rous sarcoma virus synthesized in the absence of helper virus. *J.Gen. Virol.* 5 (1969) 511-528
- Weiss, R.A., Veselý, P., Sindelarova, J.: Growth regulation and tumour formation of normal and neoplastic rat cells. *Int.J. Cancer* 11 (1973) 77-89
- Westphal, H.: Zelltransformation durch DNS-Tumorviren. *Zentralbl. Bakteriol.* 220 (1972) 27-38
- Whaley, W.G., Danwalder, M., Kephart, J.E.: Golgi apparatus: Influence on cell surfaces. *Science* 175 (1972) 596
- Whittembury, G., Sugino, N., Solomon, A.K.: Effect of anti-diuretic hormone and calcium on the equivalent pore radius of kidney slices from necturus. *Nature* 187 (1960) 699-701
- Winegrad, A.J., Renold, A.E.: Studies on rat adipose tissue in vitro. *J.Biol.Chem.* 233 (1958) 267-276
- Winzler, R.J.: Determination of serum glycoproteins. *Methods Biochem.Anal.* 2 (1955) 279-311

- Winzler, R.J., Harris, E.D., Pekas, D.J., Johnson, C.A., Weber, P.: Studies on glycopeptides released by trypsin from intact human erythrocytes. *Biochemistry* 6 (1967) 2195-2202
- Winzler, R.J.: Carbohydrates in cell surfaces. *Int.Rev.Cytol.* 29 (1970) 77-125
- Wise, G.E., Flickinger, C.J.: Relation of the Golgi apparatus to the all coat in amoebae. *Exp.Cell Res.* 61 (1970) 13-23
- Wohltmann, H.J., Narahara, H.T.: Binding of insulin - 131 I by isolated frog sartorius muscles. *J.Biol.Chem.* 241 (1966) 4931-4939
- Woo, J., Cater, D.B.: A study of the cell surface of tumor, foetal and lymph node cells by cell electrophoresis after antibody and enzymic treatment. *Biochem.J.* 128 (1972) 1273-1284
- Wu, R., Racker, E.: Regulatory mechanism in carbohydrate metabolism. III. Limiting factors in glycolysis of ascites tumor cells. *J.Biol.Chem.* 234 (1959) 1029-1035
- Wu, R., Racker, E.: Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism. IV. Pasteur effect and crabtree effect in ascites tumor cells. *J.Biol.Chem.* 234 (1959) 1036-1041
- Würker, J.: Elektrolytverschiebungen (Na^+ , K^+ , Mg^{++} und Cl^-) durch einen oberflächenaktiven Stoff in vivo und Möglichkeiten der Kompensation durch K-Mg-Asparaginat. *Dissertation* 1969
- Wulff, G., Tschesche, R.: Über die Struktur der Roßkastanien-sopone (Äscin) und die Aglykone verwandter Glykoside. *Tetrahedron* 25 (1969) 415-436
- Yahara, I., Edelman, G.M.: Restriction of the mobility of lymphocyte immunoglobulin receptors by concanavalin A. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 69 (1972) 608-612
- Yamane, K., Nathenson, S.G.: Biochemical similarity of papain-solubilized H-2^d Allo antigens from tumor cells and from normal cells. *Biochemistry* 9 (1970) 4743-4750
- Yau, T.M., Weber, M.J.: Changes in acyl group composition of phospholipids from chicken embryonic fibroblasts after transformation by Rous sarcoma virus. *Biochem.Biophys.Res. Commun* 49 (1972) 114-120
- Yoshikawa-Fukada, M., Nojima, T.: Biochemical characteristics of normal and virally transformed mouse cell lines. *J.Cell Physiol.* 80 (1972) 421-430
- Yuen, R., Schachter, H.: L-fucose metabolism in mammals. I. Pork liver L-fuconate hydro-lyase. *Can.J.Biochem.* 50 (1972) 798-806
- Zahler, P.: The structure of the erythrocyte membrane. *Experientia* 25 (1969) 449-456

Herrn Prof. Dr. med. von Bruchhausen danke ich für die freundliche Überlassung des Themas sowie für wertvolle Ratschläge und zahlreiche Anregungen bei der Anfertigung der Arbeit.

L e b e n s l a u f

Name Klaus Gruber

geboren am 30.10.1940

in Wormditt/Ostpreußen

Ausbildung: Schule:

 1946-1951 Volksschule in Falkenstein/Oberpfalz

 1951-1960 Humanistisches Gymnasium in Regensburg

 1960 Abitur

 Universität:

 1960-1964 Chemiestudium an der Julius-

 Maximillans-Universität Würzburg

 1964 Vordiplom

 1964-1967 Chemiestudium an der Freien

 Universität Berlin

 1967 Diplomprüfung

 1967-1969 Diplomarbeit: "Untersuchungen über

 die Nachweisgrenze bei γ -Spektro-

 skopie"

Tätigkeit: seit 1969 wissenschaftlicher Mitarbeiter am

 Pharmakologischen Institut der

 Freien Universität Berlin

